UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
JUL 1 61

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores: P. Huber, Basel · R. Matthey, Lausanne · A. v. Muralt, Bern · L. Ruzicka, Zürich

Redactor: H. Mislin, Basel · Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL (SCHWEIZ)

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

Articles généraux – Übersichtsreferate
Articoli riassuntivi – Surveys

R. G. Herb: Proton-Proton Scattering below 20 MeV 193
E. Klenk: Chemie und Stoffwechsel der Polyenfettsäuren . . . 199

Brèves communications – Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni – Brief Reports

A. Catsch und D. Schindewolf-Jordan: Vergleichende Untersuchungen über die Dekorporationseffektivität einiger neuerer Chelatbildner 205
A. Hofmann, A. J. Frey und H. Ott: Die Totalsynthese des Ergotamins 206
B. Nagy and Josephina Lugay: Natural Chromatography and the Accumulation of Petroleum in Rocks in View of Analysis of Bitumen from the Athabasca Deposit in Canada 207
U. Renner und D. A. Prins: Voacanga-Alkaloide V. Verknüpfung von Vobasin mit Degramin und Tabernaemontanin 209
A. F. Engel and O. J. Pollak: Free Amino Acid Patterns and other Chemical Constituents of Rabbits' Blood and Blood Vessels 210
A. Bouhuys and S.-E. Lindell: Release of Histamine by Cotton Dust Extracts from Human Lung Tissue *in vitro* 211
K. V. Nageswara Rao and P. L. Narasimha Rao: α- and β-Guttiferins 213
W. H. Laarhoven, R. J. F. Nivard, and E. Havinga: Estrogenic Activity and Steric Hindrance to Complanarity of Alkyl Substituted 4,4'-Dimethoxystilbenes 214
H. Meier: Some Physico-Chemical Properties of Mouse Red Cells and Hemoglobin 215
G. Moricca, B. Giovanella, C. Manni, and R. Cavaliere: Estimation of Decamethonium in Biological Fluids 216
F. A. Quiocho, M. O'Dell, and F. Friedberg: *N*-Bromosuccinimide Action on Creatine Phosphokinase 217
T. Gati, F. Gelencsér, and L. Selmeci: The Inhibitory Effect of Duodenal Souring on Shay Ulceration in Rat 218
W. Förster: Struktur-Wirkungsbeziehungen bei einigen Cardenoliden und Bufadienoliden nach verschiedenartigen Herzschädigungen 220
T. W. Goodwin and P. N. A. Passorn: The Incorporation of 8-^{14}C-Adenine and 8-^{14}C-Guanine into PNA of *Rhodospirillum rubrum* 221
V. Scarselli and A. Fossati: Effect of some Hyper- and Hypo-Cholesteremic Drugs on the Cholesterol Biosynthesis by Liver Homogenates 222
K. Vogler, R. O. Studer, P. Lanz, W. Lergier, and Erika Böhni: Total Synthesis of two Cyclodecapeptides Exerting Polymyxin-like Activity 223
M. Kohout and R. Krulik: Influence of Isoniazid and *p*-Aminosalicyc Acid on Plasma 17-Hydroxycorticosteroids in Guinea Pigs 224
I. Faredin, A. Benkö, M. Winter, and A. Botos: Catecholamine Content of the Arterial Walls in Experimental Hypertension 225
M. Chvapil and V. Kobrle: Changes in Proline and Hydroxyproline in Collagens during the Development of Rats 226
R. Smetana and E. Paluska: The Relation between some Serum and Liver Proteins in Rats Studied by Immunoelectrophoresis and by Ouchterlony's Double Diffusion Method 227
K. C. Kanwar: What Constitutes 'Apparato Reticolare Interno' of Golgi in the Goblet Cells of Vertebrate Intestine? 228
G. Bacci and O. Bortesi: Pure Males and Females from Hermaphroditic Strains of *Ophyotrocha puerilis* 229
H. Ursprung und E. Hadorn: Xanthindehydrogenase in Organen von *Drosophila melanogaster* 230
H. Ursprung: Xanthindehydrogenase beim Wildtyp und bei den Mutanten *white* and *brown* von *Drosophila melanogaster* . . 232
A. W. B. Cunningham: Spontaneous Potentials from Explants of Embryo Chick Pons (Myelencephalon) in Culture 233
R. C. Shukla: Histamine Stimulation of Gastric Pepsin and Hydrochloric Acid in Patients of Vitiligo 234
D. R. Waud: The Influence of Reserpine upon the Changes in Femoral Blood Flow Produced by Stimulation of the Lumbar Sympathetic Chain 234
H. R. Marti: Technische Probleme der Hämoglobin-Elektrophorese im Stärkeblock 235
M. Brenner und A. Niederwieser: Durchlaufende Dünnschicht-Chromatographie 237
R. Cheli, M. Dodero, and G. Celle: A New Biopsy-Tube for the Small Intestine (Pro Experimentis) 239

EXPERIENTIA

L'EXPERIENTIA publiera:

1° des *articles originaux* sur les récentes recherches scientifiques écrits dans une des langues principales;

2° de *brèves communications;*

3° informera ses lecteurs des événements marquants de la vie scientifique.

Die EXPERIENTIA stellt sich die Aufgabe:

1. durch *zusammenfassende Originalartikel* in einer der wissenschaftlichen Hauptsprachen von Autoren aus verschiedenen Ländern über Forschungsergebnisse berichten zu lassen, die im Vordergrund des Interesses stehen;
2. kurze *Mitteilungen* aufzunehmen;
3. durch Mitteilungen über die bedeutendsten Ereignisse des naturwissenschaftlichen Lebens zu informieren.

EXPERIENTIA si propone di pubblicare:

1. *articoli originali riassuntivi,* in una delle principali lingue usate dalla scienza, ad opera di autori diversi paesi, su risultati scientifici di grande interesse;
2. *brevi comunicazioni;*
3. comunicazioni su importanti avvenimenti nel campo delle scienze naturali.

The aim of EXPERIENTIA is:

1. to publish comprehensive articles embodying the results of recent scientific research. These will be written in one of the principal scientific languages and contributed by authors in various countries;
2. to publish *brief reports;*
3. to give information about the most important events in natural science.

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 74.–.
Adresser toute correspondance touchant la rédaction de l'EXPERIENTIA exclusivement à l'éditeur soussigné.
Dernier délai d'admission pour les manuscrits: 2 mois avant la parution. Les auteurs recevront gratuitement, s'ils le désirent, 75 tirés à part de format 14,5 sur 21 cm, sans couverture. Pour le prix d'un nombre plus grand et pour la couverture s'adresser à l'éditeur. Les tirages à part doivent être commandés *avant* l'impression du périodique.
Prix pour les annonces: $^1/_1$ page Fr. 220.–, $^1/_2$ page Fr. 132.–, $^1/_4$ page Fr. 77.–. Placements spéciaux: prix sur demande. Demandes à l'éditeur.
L'EXPERIENTIA est imprimée en Suisse.

Editions Birkhäuser S. A., Bâle 10 (Suisse), Elisabethenstrasse 19
Adresse télégraphique: Edita Bâle

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 74.–.
Tutti gli invii alla redazione di EXPERIENTIA vanno indirizzati esclusivamente alla sottoindicata casa editrice.
La redazione di ogni fascicolo si chiude 2 mesi prima della pubblicazione.
Gli autori ricevono, su desiderio, 75 estratti del formato 14,5 × 21 cm, senza copertina. Il prezzo degli estratti in più e della copertina viene indicato, su richiesta, dalla casa editrice. Gli estrati debbano essere ordinati *prima* della stampa della Rivista.
Prezzi per annunci: $^1/_1$ pag. fr. 220.–. $^1/_2$ pag. fr. 132.–, $^1/_4$ pag. fr. 77.–; per pagine speciali, accordi da stabilire. Gli annunci sono da inviare alla casa editrice.
EXPERIENTIA si stampa in Svizzera.

Casa editrice Birkhäuser S. A., Basilea 10 (Svizzera), Elisabethenstr. 19
Indirizzo telegrammi: Edita Basilea

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 74.– (DM 74.–).
Alle Zuschriften an die Redaktion sind ausschliesslich an den Verlag zu richten. Redaktionsschluss 2 Monate vor Erscheinungsdatum.
Die Autoren erhalten auf Wunsch 75 Gratisseparata im Format 14,5 × 21 cm, ohne Umschlag. Die Kosten für weitere Separata und für Umschläge sind beim Verlag zu erfragen. Separata sind *vor* dem Druck der Zeitschrift zu bestellen.
Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–; für Vorzugsseiten besondere Vereinbarung. Inseratenannahme durch den Verlag.
Die EXPERIENTIA wird in der Schweiz gedruckt.

Birkhäuser Verlag AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 19
Telegrammadresse: Edita Basel

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through booksellers or from the publishers. The annual subscription price is sFr. 74.–. All communications to the editors should be addressed to the publishers. All manuscripts for publication in a given number must be in the hands of the publishers 2 months before publication.
The authors receive, on request, 75 reprints 14,5 × 21 cm without cover free of charge. For the prices of additional reprints and covers, inquiries should be addressed to the publishers. Reprints must be ordered *before* publication.
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.
Experientia is printed in Switzerland.

Published by Birkhäuser Ltd., Basle 10 (Switzerland), Elisabethenstr. 19
Telegrams: Edita Basel

Liste des annonceurs – Verzeichnis der Inserenten – Elenco degli inserzionisti – List of Advertisers – Experienita XVII / 5

Bios Laboratories, Inc., New York
CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy AG, Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG, Basel

© *1961 Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

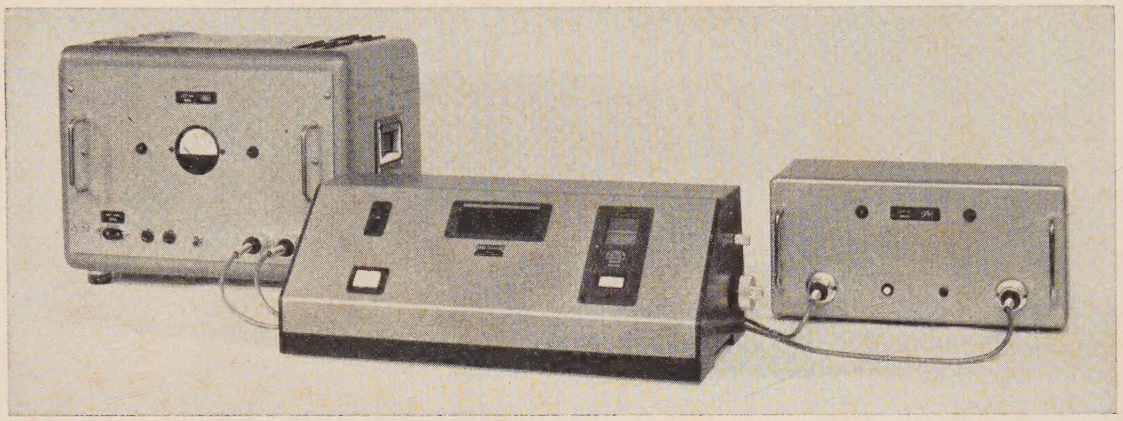
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG, Basel

ZEISS

Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter 0,005°

Besondere Merkmale:

- Hohe Meßgenauigkeit
- Frei von persönlichen Einstellfehlern und frei von Parallaxe
- Ermüdungsfreie Reihenmessung und denkbar einfache Bedienung
- Automatische Empfindlichkeitsregelung



Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50–381/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

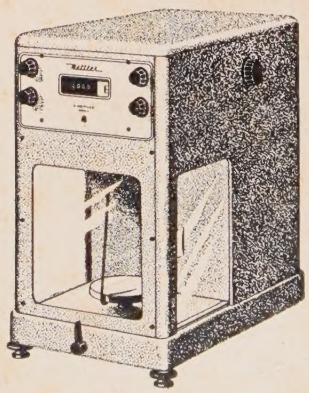
CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ Optar AG
ZÜRICH
Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



A 2

*

Am Anfang jedes chemischen Produktes steht die Forschung, und zwar

gezielte Forschung

Zufallstreffer sind selten geworden. Ein gut aufeinander abgestimmtes Räderwerk, in dem jeder Forscher Teilaufgaben löst, die näher und näher zum Ziel führen, bis eines Tages der Wurf gelingt, ist heute der einzig gangbare Weg. In den Geigy-Laboratorien führen Hunderte von qualifizierten Mitarbeitern jährlich Zehntausende von Versuchen durch. Dieser hohe Einsatz in gezielter Forschung bürgt dafür, daß Geigy auch in Zukunft bei Verbrauchern in der ganzen Welt auf Vertrauen zählen darf.

Geigy

J. R. Geigy A.G., Basel

A 7

EXPERIENTIA

Vol. XVII – Fasc. 5 Pag. 193–240 15. V. 1961

Proton-Proton Scattering below 20 MeV

By R. G. HERB*

Early Experiments

Proton scattering experiments first made unambiguous contributions to our understanding of the nature of the nucleon with the work of TUVE, HEYDENBURG, and HAFSTAD in 1936[1]. The experiment in principle is one of the simplest. Protons are accelerated to high energy by means of a machine such as a Van de Graaff generator, a cyclotron, or a transformer rectifier set. A collimated beam of high energy protons is directed onto a target of hydrogenous material or, more commonly, passes through hydrogen gas. Target thickness is chosen so that all but a few parts per million of the protons pass through the target with little change in direction and are collected in a cylindrical cup where the charge accumulated over an operating period is a measure of the number of protons that have passed through the target.

Protons that have close encounters with target nuclei may be scattered at large angles with respect to the incident beam axis. A detector system is provided to count the scattered protons in any selected angular region in order to determine the probability of scattering into this region.

If the target is a solid such as polyethylene, the detector system must be arranged to reject protons scattered by carbon nuclei or nuclei of other heavy elements. If the target is hydrogen gas, contributions from nuclei of impurity atoms can be made small and they can be monitored. Interference effects between the two protons of the hydrogen molecule appear to be negligible[2]. Effects of the two electrons of the molecule are small[3] and corrections need be made only for experiments of high accuracy. Effects of molecular motion are also negligible. Thus, to a good approximation, hydrogen gas at a pressure of 12 mm of mercury consists for the purposes of this experiment of independent stationary protons with a density of 8.4×10^{17} protons/cm^3. This is the hydrogen pressure used in the experiments of TUVE, HEYDENBURG, and HAFSTAD[1].

With hydrogen along the trajectory of the proton beam throughout the scattering chamber the target region is defined by an analyzing slit system as illustrated in Figure 1 while Figure 2 gives a view of the scattering chamber. High energy protons for this experiment were furnished by a Van de Graaff generator constructed by TUVE, HAFSTAD, and DAHL, operating in air at atmospheric pressure up to potentials of about 1 million volts. This was the first operational Van de Graaff accelerator. Generator voltage could be measured to an accuracy of about 2%. A reasonably steady proton current of about 0.02 μA passed through a thin aluminum foil at the entrance to the collimator where it was restricted by circular apertures ranging from a diameter of 2 mm at the entrance to 2.6 mm at the exit. The detector was an ionization chamber, separated from the hydrogen-filled region by a collodion foil. A pulse was produced by each scattered proton which was accepted by the analyzer slit system and passed into the ionization chamber.

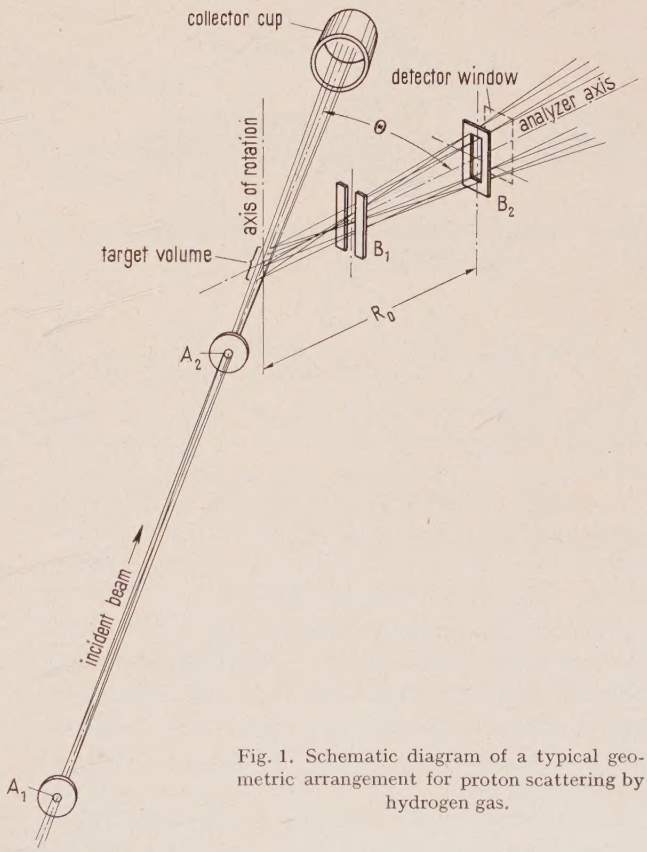


Fig. 1. Schematic diagram of a typical geometric arrangement for proton scattering by hydrogen gas.

* University of Wisconsin, Madison (U.S.A.).

[1] M. A. TUVE, N. P. HEYDENBURG, and L. R. HAFSTAD, Phys. Rev. *50*, 806 (1936).

[2] Approximate calculations by J. L. POWELL, unpublished.

[3] G. BREIT, Phys. Rev. Letters *1*, 200 (1958).

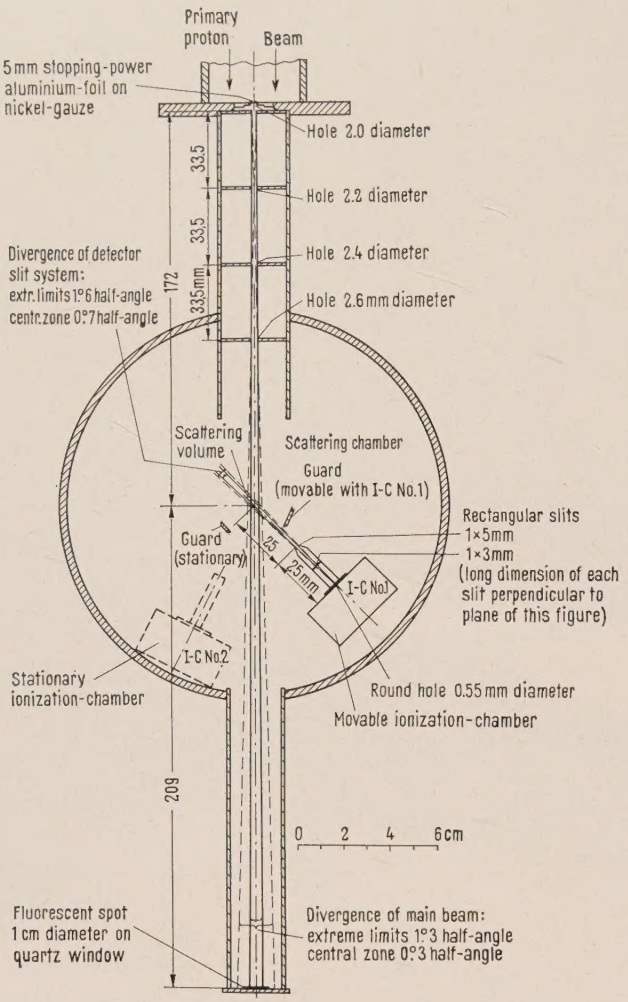


Fig. 2. Scattering chamber used by TUVE, HEYDENBURG, and HAFSTAD[1] in early experiments.

In their first paper, TUVE, HEYDENBURG, and HAFSTAD[1] reported measurements with incident protons having energies of 900, 800, 700, and 600 keV, scattered through angles from the incident beam of 15 degrees to 45 degrees. At each angle and energy a value was determined for the ratio of observed yield to the yield predicted by the Mott formula.

Interpretation

At large separation distances the force between two protons is due almost entirely to their electrical charge and this force is Coulombian except for a small correction due to vacuum polarization effects. Neglecting all but the Coulomb force, MOTT[4] computed the yield of protons scattered by protons as a function of angle and energy. Usually a departure from Coulomb scattering between protons is referred to as a departure from Mott scattering.

For separation distances comparable to nuclear dimensions other forces were to be expected between protons, and data on binding energies of nuclei and on nuclear energy levels permitted estimates of the characteristics of these forces.

Formulae developed by TAYLOR[5] and by MOTT and MASSEY[6] are presented by BREIT, CONDON, and PRESENT[7], for the scattering of protons by protons where forces at close distances depart from the Coulomb force. The incident beam of protons is represented by plane waves classified according to angular momenta. The protons making head-on collisions with target nuclei constitute the s-wave, those with one unit, $\hbar$, of angular momentum constitute the p-wave, those with two units ($2\,\hbar$) constitute the d-wave, etc. The amplitude of the outgoing waves, which when squared give yield contributions, are determined by the phase of the resultant of incoming and outgoing waves at some suitable chosen close-in boundary. As the phase difference between incident and resultant wave goes from 0 to 90°, the scattered intensity contributed goes from 0 to a maximum. Protons making head-on collisions will penetrate farthest through the Coulomb barrier at a given energy and thus we expect s-wave protons to first feel departures from the Coulomb force. P-wave protons might be expected to penetrate to the non-Coulombian regions at higher energies. For energies up to 20 MeV protons with more than 2 units of orbital angular momentum should not be expected to feel appreciably the non-Coulombian force.

In their classic paper on this subject BREIT, CONDON, and PRESENT[7] show that exploration of the force field between protons is reduced in the elastic scattering region to the problem of determining the s-wave, the p-wave, the d-wave, etc., phase shifts as a function of incident proton energy. They obtained a satisfactory fit to the data of TUVE, HEYDENBURG, and HAFSTAD utilizing only an s-wave distortion, or phase shift, by a non-Coulombian field. Any non-Coulombian p- or d-wave phase shift appeared to be small or perhaps zero. Thus protons of energies up to 900 keV were shown to penetrate appreciably into the inner non-Coulombian fields only if collisions are head-on.

A very thorough survey was then made by these authors of force fields that gave the observed s-wave phase shifts. The force was shown to be attractive and to be short range with little or no effect for distances beyond about 6×10^{-13} cm. Details of the variation of this force with distance could not be determined and thus the shape of the resulting potential well could not be established.

One potential well found to give a good fit to the data had sides of infinite slope, width 2.8×10^{-13} cm and depth 10.5 MeV. This is called a 'square well' and

[4] N. F. MOTT, Proc. Roy. Soc. *A 118*, 542 (1928).
[5] H. M. TAYLOR, Proc. Roy. Soc. *A 134*, 103 (1931); *A 136*, 605 (1932).
[6] N. F. MOTT and H. S. W. MASSEY, *The Theory of Atomic Collisions* (Oxford University Press).
[7] G. BREIT, E. U. CONDON, and R. D. PRESENT, Phys. Rev. *50*, 825 (1936).

has been widely used as a convenient approximation although it is recognized as highly artificial.

Other experiments had given information on the interaction between a neutron and a proton in the singlet s state (the state of zero angular momentum and with spins antiparallel) and BREIT, CONDON, and PRESENT[7] concluded that this interaction between neutron and proton is very nearly equal to that between two protons, neglecting the Coulomb force between protons.

Extension of Experimental Work through 1941

With the success of the method amply demonstrated for investigation of the nature and characteristics of nucleons a succession of experiments were carried through. HAFSTAD, HEYDENBURG, and TUVE[8,9] made measurements at proton energies down to 450 keV and later with new improved apparatus repeated their previous measurements over the energy region up to 900 keV. Some of their data are shown in Figure 3a and 3b where the ratios of observed scattering yield values to computed Mott yield values are plotted.

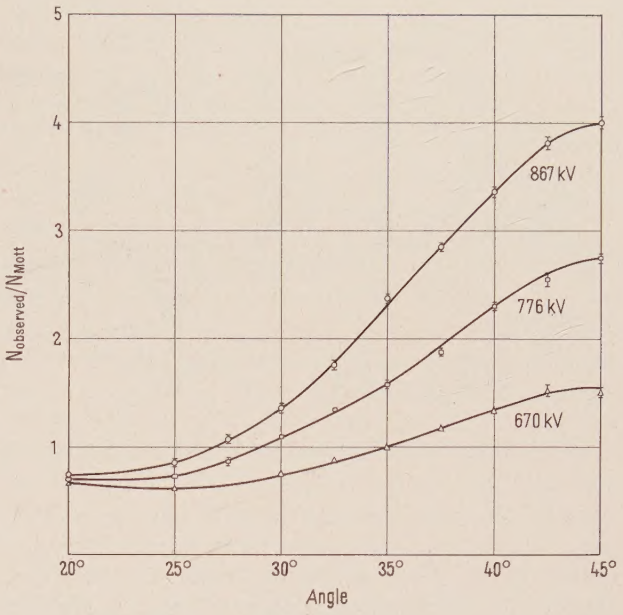


Fig. 3a

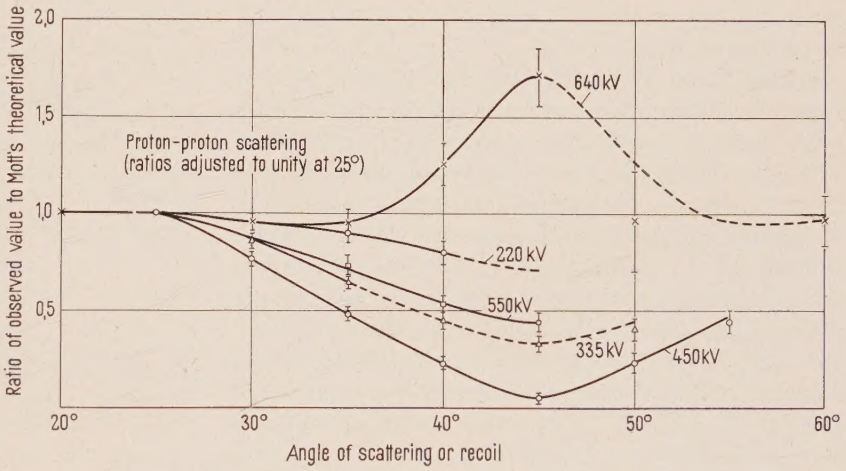


Fig. 3b

Fig. 3a, 3b. Measurements of HAFSTAD, HEYDENBURG, and TUVE[8] showing departures from Coulombian scattering. Interference between the repulsive Coulomb force and an attractive nuclear force causes the low yield at 45° for proton energies near 400 keV.

At Wisconsin HERB, KERST, PARKINSON, and PLAIN[10] made measurements extending from 860 keV to approximately 2.4 MeV and RAGAN, KANNE, and TASCHEK[11] investigated the energy region from 200 keV to 300 keV. Values of the s-wave phase shift were now available at closely spaced energies up to 2.4 MeV. Where values for different groups overlapped, agreement was good. A square well of 2.8×10^{-13} cm width and 10.5 MeV depth fit all data satisfactorily. Details of the shape of the potential well were still not extablished but the variety of potential shapes permitted was now more restricted. Evidence for non-Coulombian contributions due to protons having one or more units of angular momentum (p, d, etc. waves) was still inconclusive. Within the accuracy of the data only protons making head-on collisions penetrated to where appreciable departures from Coulomb forces are felt.

Experimental Contributions since 1950

During the past decade a great many proton-proton scattering experiments have been carried out over a wide range of energies. Only a few of these can be mentioned in this short review. WORTHINGTON, MCGRUER, and FINDLEY[12] developed techniques which gave values that appeared to be accurate to a few

[8] L. R. HAFSTAD, N. P. HEYDENBURG, and M. A. TUVE, Phys. Rev. *53*, 239 (1938).

[9] N. P. HEYDENBURG, L. R. HAFSTAD, and M. A. TUVE, Phys. Rev. *56*, 1078 (1939).

[10] R. G. HERB, D. W. KERST, D. B. PARKINSON, and G. J. PLAIN, Phys. Rev. *55*, 998 (1939).

[11] G. L. RAGAN, W. R. KANNE, and R. F. TASCHEK, Phys. Rev. *60*, 628 (1941).

[12] H. R. WORTHINGTON, J. N. MCGRUER, and D. E. FINDLEY, Phys. Rev. *90*, 899 (1953).

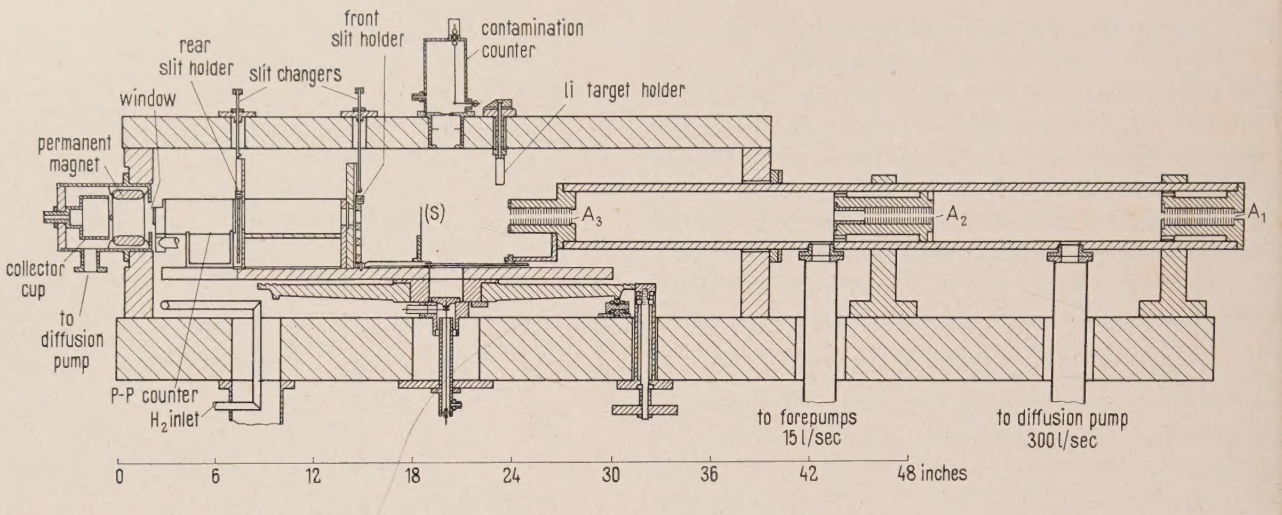


Fig. 4a

tenths of 1%. Their scattering chamber is shown in Figure 4a and 4b. Measurements from 1.8 MeV to 4.2 MeV were analyzed by HALL and POWELL[13] and inclusion of small p-wave contributions improved the agreement with measurement over that given by pure s-waves. Later developments have cast some doubt on this interpretation.

YNTEMA and WHITE[14], utilizing 18 MeV protons from a cyclotron and solid targets of polyethylene, polystyrene, and nylon, obtained scattering yields as a function of angle with accuracies that appeared to be about 1%. At this energy non-Coulombian forces might be expected for protons with one or two units of angular momentum. Their best fits gave small p- and d-wave effects. Other measurements of particular importance in the energy region below 20 MeV are those of JOHNSTON and YOUNG[15] at 10 MeV. COOPER, FRISCH, and ZIMMERMAN[16] made measurements in the region from 350 keV to 420 keV. They made use of interference between the repulsive Coulomb force and the attractive nuclear force and found that 45° scattering went to a minimum at 383.9 keV. From this result a value was determined for the s-wave phase shift at this energy.

Recent Theoretical Analyses

Theoretical analysis of proton scattering results in the low energy region have been greatly influenced by results of a large number of experiments at energies extending up to the BeV region where incident protons with many units of angular momentum feel the non-Coulombian force. Phase shift analyses have in no case given unique values and thus information on the force field between protons has continued to be ambiguous.

HULL and SHAPIRO[17], utilizing a high speed digital computer, demonstrated that even in the low energy region where data are relatively accurate and angular momenta beyond 2 $\hbar$ are not expected, unique solutions are not in general obtained. Incident p-wave (or other odd momenta) protons have spins parallel to spins of

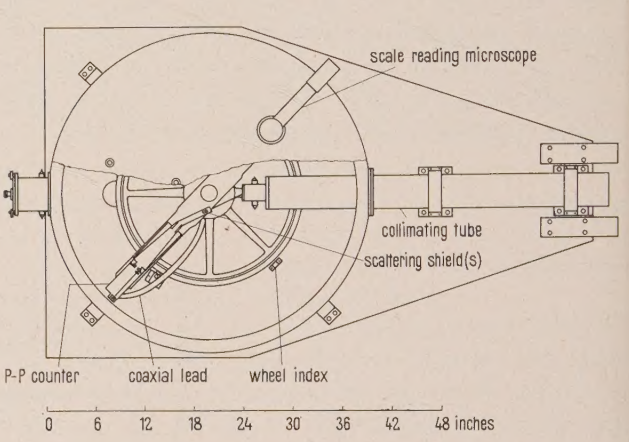


Fig. 4b

Fig. 4a, 4b. Two views of the scattering chamber used by WORTHINGTON, MCGRUER, and FINDLEY[12], and by KNECHT, MESSELT, BERNERS, and NORTHCLIFFE[25]. Hydrogen flows continuously into the chamber and flows out through the high impedance regions near A_3, A_2, and A_1.

target protons. Spin and orbital angular momenta for incident p-wave protons can therefore give a resultant angular momentum of zero, $\hbar$, or 2 $\hbar$, and interactions may not be the same for these three values. Thus the number of parameters is great, and demands that must be met by the experimentalists to provide unique solutions are severe. The analyses of HULL and SHAPIRO[17], of MACGREGOR[18], of HELLER[19], and others show that the most accurate data available can be fitted with a variety of p- and d-wave contributions.

[13] H. H. HALL and J. L. POWELL, Phys. Rev. *90*, 912 (1953).
[14] J. L. YNTEMA and M. G. WHITE, Phys. Rev. *95*, 1226 (1954).
[15] L. H. JOHNSTON and D. E. YOUNG, Phys. Rev. *116*, 989 (1959).
[16] D. I. COOPER, D. H. FRISCH, and R. L. ZIMMERMAN, Phys. Rev. *94*, 1209 (1954).
[17] M. H. HULL, jr., and J. SHAPIRO, Phys. Rev. *109*, 846 (1958).
[18] M. H. MACGREGOR, Phys. Rev. *113*, 1559 (1959).
[19] L. HELLER, Phys. Rev. *120*, 627 (1960).

It is generally agreed that polarization data are needed. In all experiments discussed above, spins of incident protons were randomly oriented and spins of target nuclei were also randomly oriented. Additional information may be obtained on contributions from waves of odd orbital momentum if spins of incident or target protons are oriented preferably in one direction. These experiments are difficult in the low energy region but results of value have already been obtained[20, 21]. More extensive results can be expected within the next few years. Polarization measurements will undoubtedly be of great help in restricting the choice of phase shifts that give satisfactory fits to data. Experiments of higher accuracy without spin orientation should also be of value and may well be necessary for a unique determination of the interaction fields between protons. In the next section some recent advances in accuracy and possibilities for further progress will be discussed.

Progress and Possibilities in Accuracy of Measurements

FOLDY and ERIKSEN[22] first showed that vacuum polarization may make appreciable contribution in proton-proton scattering. DURAND[23] extended these computations and showed that contributions extend to very high orbital angular momentum values. DURAND also gives relativistic corrections of importance for data of high accuracy. Computations by SILVERSTEIN[24] on geometric factors of gas scattering chambers (effective solid angle of detection and effective target thickness) showed that previous calculations had not been sufficiently accurate for the newer experiments.

KNECHT, MESSELT, BERNERS, and NORTHCLIFFE[25] made measurements at 1.8 MeV with the apparatus of Figure 4 and were unable to fit their data satisfactorily with a reasonable choice of phase shifts until the vacuum polarization and relativistic corrections of DURAND[23] were applied. Results finally obtained by KNECHT, MESSELT, BERNERS, and NORTHCLIFFE[25] set very low limits on p- and d-wave contributions and appeared to establish an s-wave phase shift with high accuracy.

Some of the requirements to be met for extension of accuracy over the energy region below 20 MeV will now be discussed.

The Accelerator. A compact beam of protons, highly monochromatic in energy, with accurately known energy and with low angular divergence is clearly advantageous. Either a transformer rectifier set or a Van de Graaff generator can satisfy these requirements. Van de Graaff generators utilizing hydrogen negative ions may soon be available for energies up to about 20 MeV.

Beam Collimation. In the work of WORTHINGTON, MCGRUER, and FINDLEY[12] and of KNECHT, MESSELT, BERNERS, and NORTHCLIFFE[25] the proton beam passes through two circular apertures of $1\text{–}^1/_2$ mm diameter, spaced 1 m apart. A series of diaphragms with larger holes contribute to impedance for gas flow. Protons impinging on the edges of apertures A3 and A1 (of Fig. 4a) may after some energy loss be scattered out of the metal and a small percentage of these protons will be scattered into the beam. Four MeV protons may enter the beam after impinging on a steel diaphragm as far as 0.05 mm out from the edge. If the aperture holes are shrunk to smaller diameters, the beam is more accurately fixed in angle and in position, but a larger fraction of the protons are degraded in energy.

Low energy protons in the beam may cause large errors at small scattering angles. From these considerations, but without the benefit of accurate calculations, a high Z material was used for the defining apertures of the collimator used by KNECHT et al.[25]. A large proportion of the protons scattered out are thereby scattered through large angles and do not appear in the beam.

KNECHT et al.[25] found that asymmetries introduced as the beam shifts in the collimator produce errors in small angle cross section measurements. Results were much improved when a pair of pickup plates were installed in the collector cup to detect beam asymmetry in the plane of the scattering chamber. Error signals fed to a small deflecting magnet just beyond the first aperture (A1 of Fig. 4a) maintained the beam accurately in a vertical plane passing through the collimator axis. Improvement of beam centering in the collimator should decrease the proportion of low energy protons scattered from aperture edges. Complete automatic positioning of the beam in the collimator may be a requirement for measurements of high accuracy.

Analyzer Apertures. Apertures B1 and B2 of Figure 1 determine effective target thickness and effective solid angle subtended by the detector. Some of the protons hitting the edges of these apertures will not be stopped in the materials but will be scattered out, and a certain percentage of those scattered out will reach the detector. The effective width of B1 and the effective area of B2 are therefore greater than the measured values. COURANT[26] developed formulae for computing these effects and he computed corrections for the slit systems used in the experiments of YNTEMA and WHITE[14] (see Fig. 5). NORTHCLIFFE[27], utilizing COURANT's expressions, made extensive calculations of corrections to be applied in the work of KNECHT, MESSELT, BERNERS, and NORTHCLIFFE[25]. The computations were difficult and their accuracy was hard to assess. NORTHCLIFFE[27]

[20] K. W. BROCKMAN, jr., Phys. Rev. *110*, 163 (1958).
[21] I. ALEXEFF and W. HAEBERLI, Nuclear Phys. *15*, 609 (1960).
[22] L. L. FOLDY and E. ERIKSEN, Phys. Rev. *98*, 775 (1955).
[23] L. DURAND III, Phys. Rev. *108*, 1597 (1957).
[24] E. A. SILVERSTEIN, Nuclear Instr. *4*, 53 (1959).
[25] D. J. KNECHT, S. MESSELT, E. D. BERNERS, and L. C. NORTHCLIFFE, Phys. Rev. *114*, 550 (1959).
[26] E. D. COURANT, Rev. Sci. Instr. *22*, 1003 (1951).
[27] L. C. NORTHCLIFFE, Ph. D. Thesis, University of Wisconsin (1957).

found that the magnitude of slit edge contributions depends in a complicated way on the atomic number of the material and on the density of the material. Stellite, which had been used in the experiment, was found to be one of the better materials to form aperture B2. These calculations indicated that beryllium would have been considerably better than stellite to form the aperture B1. Beryllium slits were made up by the Argonne Laboratory but as yet have not been used. BECKER[28] made more extensive Monte Carlo calculations using a digital computor. According to these calculations, beryllium may not be appreciably better than the stellite that had been used.

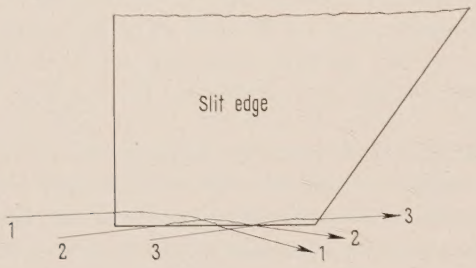


Fig. 5. Showing how protons after undergoing several scatterings in a slit edge may re-enter a beam or may pass through to a detector. In COURANT's[26] analysis protons were divided into the three classes illustrated in this Figure.

Corrections can be made for slit edge scattering if the detector gives an accurate measure of proton energies. In the experiments of WORTHINGTON, MCGRUER, and FINDLEY[12] and in the later experiments of KNECHT, MESSELT, BERNERS, and NORTHCLIFFE[25] corrections were based to a considerable extent on analysis of pulse heights from the proportional counter used in the experiments.

Slit edge scattering contributed substantially to the uncertainties in the experiments referred to above. They constitute perhaps the most difficult of the problems to be faced in experiments of higher accuracy.

The Detector. A detector to be satisfactory for precise experiments in proton-proton scattering must have an efficiency very close to 100%. A proportional counter meets this requirement satisfactorily if carefully designed. A proportional counter, however, does suffer from a number of disadvantages. The window separating the counter chamber from the scattering chamber must meet very stringent requirements. It must be thin to avoid great energy loss and it must be capable of withstanding a substantial pressure difference without breakage, gas leakage, or diffusion. A material of low atomic number is advantageous to hold large angle scattering to acceptable values. All characteristics of the counter must be very carefully studied as a function of type of gas, gas pressure, and voltage. A large counter volume filled with a heavy gas at high pressure is needed to completely stop protons having energies of a few MeV. These requirements are not compatible with the need for fast electron collection and uniformity of pulse height for a given proton energy. It is therefore necessary to use relatively low pressure gas so that protons having energies of a few MeV lose only a fraction of this energy in passing through the counter. Energy analysis is possible under these conditions but it is difficult.

The scintillation detector now appears to be satisfactory for protons of 5 MeV and above, and for lower energy protons the new biased junction detectors show promise. If they prove to be satisfactory the proton scattering problem will be greatly simplified.

Other Measurements and Corrections. Other measurements to be made such as hydrogen pressure and temperature, the effective target thickness, and the effective solid angle of the detector can be determined with care to one or two hundredths of 1%. The integration of beam current and measurement of the total charge collected during a given operational period present problems of some difficulty. Perhaps the most serious of these problems is the measurement of the capacitance of the condenser used for charge storage. Condensers utilizing polystyrene as a dielectric have been almost universally used in recent experiments because of their low polarization (soak-in) characteristics, and low leakage. The measurement of condenser capacitance to an accuracy of 0.05% or better requires a great deal of difficult and painstaking work. Also to be faced is the problem of possible change in capacitance with changes in temperature, in barometric pressures, or with any small distortion of the condenser case caused by handling.

Concluding Remarks

A sense of disappointment may be felt in considering the immense amount of experimental work and theoretical analysis that have been concentrated onto the problem of proton-proton scattering with results giving only a very qualitative understanding of the nucleon-nucleon interactions. We should, however, consider that the nucleons which two decades ago were thought of as simple elementary particles now appear to be taking on characteristics and structure of great complexity. Perhaps the interactions of highly complex particles should not be expected to be simple and to yield easily to measurements.

We can safely conclude that all proton-proton scattering measurements must be repeated with higher accuracy. Because of technical advances, difficulties expected in measurements accurate to 1 or 2 tenths of 1% should not be appreciably greater than those encountered a decade or two ago for measurements accurate to 1 or 2%.

[28] R. L. BECKER, Ph. D. Thesis, Yale University (1957).

Zusammenfassung. Die Resultate der älteren Proton-Proton-Streuexperimente konnten durch die Annahme erklärt werden, dass Protonen, die einen Zentralstoss erleiden, sich bei Annäherung auf etwa 3×10^{-13} cm stark anziehen. Die Form des entsprechenden Potentialtopfes konnte nicht festgelegt werden. Auf Grund späterer Experimente konnte die zulässige Form des Potentials begrenzt, aber nicht eindeutig bestimmt werden.

Für Protonen mit höherem Bahndrehimpuls zeigen sich unterhalb 20 MeV nur kleine Abweichungen von der Rutherfordschen Streuung, und nur wenig ist bekannt über die Natur der Wechselwirkung.

Die experimentellen Probleme, welche der weiteren Verbesserung der Messgenauigkeit im Wege stehen, werden diskutiert.

Chemie und Stoffwechsel der Polyenfettsäuren *

Von E. Klenk**

Für das Problem, auf welches im folgenden näher eingegangen werden soll, sind zwei schon längere Zeit zurückliegende Entdeckungen von besonderer Bedeutung. Es handelt sich einerseits um die Auffindung einer C_{20}-Tetraensäure in den Leberphosphatiden durch Hartley[1], und andererseits um den wohlbekannten Befund von Burr und Burr[2] über die essentielle Natur der im Nahrungsfett vorkommenden Polyensäuren von der Art der Linol- und Linolensäure.

Die C_{20}-Tetraensäure, die später den Namen Arachidonsäure erhielt, erwies sich als regelmässiger Baustein der Phosphatide der Leber und anderer Organe. Sie besitzt ebenfalls die Eigenschaften einer essentiellen Fettsäure[3]. Ihre biologische Wirksamkeit übertrifft die der Linolsäure um ein mehrfaches. Nach Smedley-MacLean[4] ist die Arachidonsäure $\Delta^{5,8,11,14}$-Eicosatetraensäure. Von der endständigen Methylgruppe aus gerechnet befinden sich die ersten beiden Doppelbindungen an derselben Stelle wie in der Linolsäure. Wegen dieser Ähnlichkeit der chemischen Konstitution hat auch Smedley-MacLean bereits angenommen, dass die Arachidonsäure im Tierkörper aus exogen zugeführter Linolsäure durch Kettenverlängerung und Dehydrierung entsteht. Der exakte Beweis dafür wurde erst viele Jahre später von Mead et al.[5] mit Hilfe der Tracermethode erbracht.

Im Anfang der dreissiger Jahre hatten wir[6] gefunden, dass in den Organphosphatiden ausser den C_{20}-Polyensäuren von der Art der Arachidonsäure auch regelmässig noch C_{22}-Polyensäuren vorkommen und dass diese letzteren noch stärker ungesättigt sind als die Arachidonsäure. Sie gleichen ihrem Verhalten nach der Clupanodonsäure der Fischöle, die damals als eine Docosapentaensäure angesprochen wurde. Es war offensichtlich, dass die C_{20}- und C_{22}-Polyensäuren der Organphosphatide der Säugetiere und die Polyensäuren der Fischöle in naher Beziehung zueinander stehen mussten.

Nach einer über zehnjährigen Unterbrechung, bedingt durch die Kriegsereignisse, konnten diese Untersuchungen erst im Jahre 1950 wieder aufgenommen werden. Als besonders wertvoll für alle weiteren Versuche auf diesem Gebiet erwies sich eine von uns[7] ausgearbeitete Methode des oxydativen Ozonidabbaus der Polyensäuren und der quantitativen chromatographischen Bestimmung der dabei auftretenden Abbaudicarbonsäuren. Nimmt man als Beispiel die Arachidonsäure (siehe die Konstitutionsformel), so führt theoretisch der oxydative Abbau zu einem Mol Glutarsäure und drei Mol Malonsäure/Mol Polyensäure. Bei den bisherigen Abbaumethoden tritt Malonsäure nicht oder nur spurenweise auf, zu fassen sind nur die höheren Dicarbonsäuren. Mit der neuen Methode erhält man Malonsäure in reichlichen Mengen, in der Regel 50% der Theorie, die höheren Dicarbonsäuren jedoch in nahezu quantitativer Ausbeute. Diese Methode ermöglicht es auch, die Dicarbonsäuren, die vom Carboxylende stammen, und diejenigen, die aus der Mitte der Kohlenstoffkette herausgespalten werden, zu unterscheiden. Wird nämlich der Abbau mit dem Ester

* Nach einem Vortrag auf der gemeinsamen Tagung der deutschen, französischen und schweizerischen Biochemiker in Zürich vom 10.–12. Oktober 1960.

** Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Köln.

[1] T. Hartley, J. Physiol. *38*, 353 (1909).

[2] G. O. Burr und M. M. Burr, J. biol. Chem. *82*, 345 (1929); *86*, 587 (1930).

[3] O. Turpeinen, J. Nutrition *15*, 351 (1938).

[4] L. C. A. Nunn und I. Smedley-MacLaen, Biochem. J. *32*, 2187 (1938). – D. E. Dolbey, L. C.A. Nunn und I. Smedley-MacLean, Biochem. J. *34*, 1422 (1940). – C. L. Arcus und I. Smedley-MacLean, Biochem. J. *37*, 1 (1943).

[5] J. F. Mead, G. Steinberg und D. H. Howton, J. biol. Chem. *205*, 683 (1953).

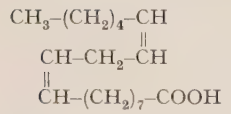
[6] a) E. Klenk, Z. physiol. Chem. *192*, 217 (1930); b) *200*, 51 (1931); c) *206*, 25 (1932). – d) E. Klenk und O. v. Schönebeck, Z. physiol. Chem. *194*, 191 (1931); e) *209*, 112 (1932). – f) E. Klenk und J. Dittmer, Z. physiol. Chem. *244*, 203 (1936).

[7] E. Klenk und W. Bongard, Z. physiol. Chem. *290*, 181 (1952).

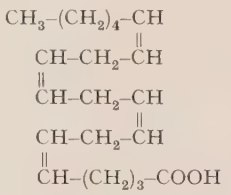
durchgeführt, so stammen alle freien Dicarbonsäuren aus der Mitte der Kohlenstoffkette. Wir[8] fanden, dass das Estergemisch der C_{22}-Polyensäuren genau so wie das der C_{20}-Polyensäuren beim Abbau als einzige freie Dicarbonsäure Malonsäure ergibt. Allen C_{20}- und C_{22}-Polyensäuren der Organphosphatide musste also ebenso wie der Arachidonsäure Divinylmethanstruktur zukommen. In entsprechender Weise konnte auch die Divinylmethanstruktur der in den Fischölen vorkommenden Polyensäuren bewiesen werden[9]. Bisher hatte man diesen Säuren neben der Divinylmethan- auch Divinyläthanstruktur zugeschrieben. Dadurch sollten sich die Polyensäuren der Fischöle in charakteristischer Weise von den Polyensäuren anderer Herkunft unterscheiden.

Schon diese ersten orientierenden Versuche zur Konstitutionsaufklärung der Polyensäuren der Organphosphatide zeigten, dass als höchstungesättigte Fettsäuren neben der Arachidonsäure auch noch die $\Delta^{5,8,11,14,17}$-Eicosapentaensäure und die $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$-Docosahexaensäure vorkommen (siehe die Konstitutionsformeln). Sowohl die Pentaen- wie auch die Hexaensäure konnten auch unter den Polyensäuren der Fischöle nachgewiesen werden. Die Versuche haben weiter gezeigt, dass diese höchstungesättigten Fettsäuren stets noch von grösseren oder kleineren Mengen schwächer ungesättigten C_{20}- und C_{22}-Polyensäuren begleitet werden.

Polyensäuren vom Linolsäuretyp

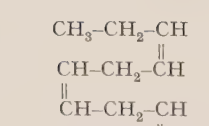


$\Delta^{9,11}$-Octadecadiensäure (Linolsäure)

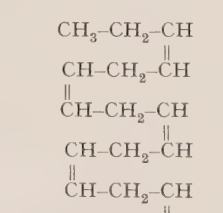


$\Delta^{5,8,11,14}$-Eicosatetraensäure (Arachidonsäure)

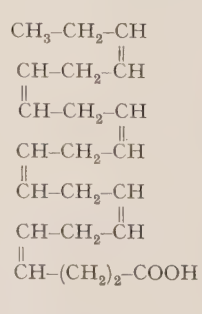
Polyensäuren vom Linolensäuretyp



$\Delta^{9,12,15}$-Octadecatriensäure (Linolensäure)



$\Delta^{5,8,11,14,17}$-Eicosapentaensäure



$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$-Docosahexaensäure

In der Folge haben wir uns dann mit dem nicht ganz einfachen Problem der Zerlegung des sehr komplexen Polyensäuregemisches in die einzelnen Komponenten beschäftigt. Tabelle I gibt einen Überblick über die isolierten Polyensäuren und deren Konstitution. Isolierbar sind alle Polyensäuren, soweit sie sich in der Kettenlänge und dem Grad der Ungesättigtheit voneinander unterscheiden. Nicht trennbar sind Isomerengemische. Jedoch konnte auch in diesen Fällen die Konstitution der einzelnen Komponenten ermittelt werden. Die Tabelle enthält einerseits die Polyensäuren der Organphosphatide der Säugetiere und andererseits die der Fischöle (Heringsöl).

Allen diesen Polyensäuren, sowohl denen der Organphosphatide wie denen der Fischöle, kommt demnach in der Tat Divinylmethanstruktur zu. Ausserdem ergibt sich eine auffallende Regelmässigkeit in der Lage der Doppelbindungen. Sie wird am besten ersichtlich, wenn man die Stellung in bezug auf die endständige Methylgruppe betrachtet. Die erste Doppelbindung befindet sich dann jeweils an derselben Stelle wie in der Öl-, der Linol- oder der Linolensäure, also in Stellung 9, 6 oder 3. Es handelt sich also durchwegs um Polyensäuren vom Öl-, Linol- oder Linolensäuretyp. Die vom Ölsäuretyp sind in den Organphosphatiden normalerweise nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Sie fehlen in den Fischölen überhaupt vollständig. In den Fischölen kommen auch die vom Linolsäuretyp nur in verhältnismässig kleinen Mengen vor, vorherrschend sind die vom Linolensäuretyp[21].

Eine Ausnahme von dieser Regel machen die C_{16}-Polyensäuren der Fischöle, die in den Organphosphatiden der Säugetiere fehlen. Diese gehören der Hauptsache nach einem ganz andersartigen Typ an. Im übrigen sind von AHRENS et al.[22] aus Menhadenöl fast genau dieselben Polyensäuren isoliert worden. Zu erwähnen ist auch die Arbeitsgruppe um HAHN, SILK, WHITCUT und SUTTON[23], die fast gleichzeitig mit uns

[8] a) E. KLENK und W. BONGARD, Z. physiol. Chem. *291*, 147 (1952). – b) E. KLENK und A. DREIKE, Z. physiol. Chem. *300*, 213 (1955).
[9] E. KLENK und W. BONGARD, Z. physiol. Chem. *292*, 51 (1953). – E. KLENK, Intern. Conference on Biochemistry. Problems of Lipids (Koninklijke Vlaamse Academie voor Wetenschappen, Letteren en schone Kunsten van Belgie, Brüssel 1953), p. 33.
[10] E. KLENK und F. LINDLAR, Z. physiol. Chem. *301*, 156 (1955).
[11] E. KLENK und W. MONTAG, Liebigs Ann. *604*, 4 (1957).
[12] E. KLENK und F. LINDLAR, Z. physiol. Chem. *299*, 74 (1955).
[13] E. KLENK und H. J. TOMUSCHAT, Z. physiol. Chem. *308*, 165 (1957).
[14] E. KLENK und W. MONTAG, J. Neurochem. *2*, 233 (1958).
[15] E. KLENK und W. MONTAG, J. Neurochem. *2*, 226 (1958).
[16] E. KLENK und H. STEINBACH, Z. physiol. Chem. *316*, 31 (1959).
[17] E. KLENK und H. BROCKERHOFF, Z. physiol. Chem. *310*, 153 (1958).
[18] E. KLENK und H. BROCKERHOFF, Z. physiol. Chem. *307*, 272 (1957).
[19] E. KLENK und L. BRUCKER-VOIGT, Z. physiol. Chem., im Druck.
[20] E. KLENK und D. EBERHAGEN, Z. physiol. Chem. *307*, 42 (1957).
[21] E. KLENK in H. M. SINCLAIR, *Essential Fatty Acids*, Proc. 4. Intern. Conf. Biochem. Probl. Lipids (Oxford 1957), p. 57.
[22] W. STOFFEL und E. H. AHRENS jr., J. Amer. chem. Soc. *80*, 6604 (1958).
[23] M. H. SILK und H. H. HAHN, Biochem. J. *57*, 582 (1954). – J. M. WHITCUTT und D. A. SUTTON, Biochem. J. *63*, 469 (1956). – J. M. WHITCUTT, Biochem. J. *67*, 60 (1957).

Tab. I. Zusammenstellung der in den Organphosphatiden und Fischölen vorkommenden Polyensäuren

	Aus Organphosphatiden von Säugetieren	Lage der Doppelbindungen bezogen auf endständige Methylgruppe	Aus Fischölen (Heringsöl)	Lage der Doppelbindungen, bezogen auf endständige Methylgruppe
C_{16}			$\Delta^{9,12}$-Diensäure[16]	4 7
			$\Delta^{6,9,12}$-Triensäure[16]	4 7 10
			$\Delta^{6,9,12,15}$-Tetraensäure[16]	1 4 7 10
			$\Delta^{4,7,10,13}$-Tetraensäure[16]	3 6 9 12
C_{18}	$\Delta^{9,12}$-Diensäure[6a,8b]	6 9	$\Delta^{9,12}$-Diensäure[17]	6 9
	$\Delta^{9,12,15}$-Triensäure[8a]	3 6 9	$\Delta^{9,12,15}$-Triensäure[17]	3 6 9
			$\Delta^{6,9,12,15}$-Tetraensäure[18]	3 6 9 12
C_{20}	$\Delta^{8,11}$-Diensäure[11]	9 12	$\Delta^{11,14}$-Diensäure[19]	6 9
	$\Delta^{11,14}$-Diensäure[10,11]	6 9	$\Delta^{8,11,14}$-Triensäure[19]	6 9 12
	$\Delta^{5,8,11}$-Triensäure[10,11]	9 12 15	$\Delta^{11,14,17}$-Triensäure[19]	3 6 9
	$\Delta^{8,11,14}$-Triensäure[10,11]	6 9 12	$\Delta^{5,8,11,14}$-Tetraensäure[19]	6 9 12 15
	$\Delta^{5,8,11,14}$-Tetraensäure[10,11]	6 9 12 15	$\Delta^{8,11,14,17}$-Tetraensäure[19]	3 6 9 12
	$\Delta^{5,8,11,14,17}$-Pentaensäure[11]	3 6 9 12 15	$\Delta^{5,8,11,14,17}$-Pentaensäure[19,20]	3 6 9 12 15
C_{22}	$\Delta^{10,13}$-Diensäure[13]	9 12		
	$\Delta^{7,10,13}$-Triensäure[13,14]	9 12 15		
	$\Delta^{7,10,13,16}$-Tetraensäure[12,13]	6 9 12 15		
	$\Delta^{4,7,10,13,16}$-Pentaensäure[12,14]	6 9 12 15 18		
	$\Delta^{7,10,13,16,19}$-Pentaensäure[13,14]	3 6 9 12 15	$\Delta^{7,10,13,16,19}$-Pentaensäure[17]	3 6 9 12 15
	$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$-Hexaensäure[12]	3 6 9 12 15 18	$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$-Hexaensäure[17]	3 6 9 12 15 18
C_{24}	$\Delta^{9,12,15,18}$-Tetraensäure[15]	6 9 12 15		

die Isolierung und Konstitutionsermittlung der höchstungesättigten C_{18}-, C_{20}- und C_{22}-Polyensäuren von Fischölen durchführte. Diese Arbeitsgruppe hat auch die in ihrer Konstitution so eigenartige C_{16}-Tetraensäure ($\Delta^{6,9,12,15}$-Hexadecatetraensäure) entdeckt.

Unsere Befunde über die Konstitution der in den Organphosphatiden der Säugetiere vorkommenden Polyensäuren war von besonderem Interesse für die Frage nach ihrer Biogenese. Ich erwähnte bereits die Hypothese von SMEDLEY-MACLEAN, wonach die Arachidonsäure aus Linolsäure durch Kettenverlängerung und Einführung weiterer Doppelbindungen entsteht und dass MEAD diese Hypothese auf eine gesicherte experimentelle Grundlage gestellt hat. Es ist nun naheliegend anzunehmen, dass alle anderen Polyensäuren vom Linolsäuretyp ebenfalls aus Linolsäure und die vom Linolensäuretyp in entsprechender Weise aus Linolensäure entstehen. Linol- und Linolensäure aber müssen bekanntlich als essentielle Fettsäuren mit der Nahrung zugeführt werden. Der tierische Organismus ist nicht in der Lage, sie selbst zu bilden. Dies gilt zum mindesten für die Ratte. Wir[24] haben deshalb schon vor einiger Zeit den Einbau von Acetat in die Polyensäuren der Leberphosphatide bei der Ratte studiert, wobei das Acetat mit ^{14}C markiert war. Unter den beim oxydativen Ozonidabbau der Polyensäuren entstehenden Dicarbonsäuren war nahezu die Gesamtaktivität in der Bernsteinsäure und den höheren Dicarbonsäuren, also in denjenigen Dicarbonsäuren, die vom Carboxylende stammen. Die aus der Mitte der Kohlenstoffkette herausgespaltene Malonsäure zeigte demgegenüber nur eine geringe Aktivität. Das Versuchsergebnis sprach also durchaus für die Bildung der C_{20}- und C_{22}-Polyensäuren aus einer inaktiven exogenen Vorstufe von der Art der Linol- bzw. Linolensäure.

Aufschluss über die Natur der aus Linolsäure einerseits und aus Linolensäure andererseits gebildeten Polyensäuren erhielten wir[25] aus einfachen Fütterungsversuchen mit Ratten ohne Anwendung von Isotopen. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe erhielt eine fettfreie Grunddiät ohne Zulage, die zweite die Grunddiät mit Linolsäurezulage, die dritte die Grunddiät mit einer Zulage von Linolensäure. Von jeder Gruppe wurde die Zusammensetzung der Polyensäurefraktion der Leberphosphatide bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle II zusammengestellt. Der Polyensäuregehalt der Lebern unterscheidet sich kaum voneinander, aber die Zusammensetzung differiert in jeder Gruppe sehr stark, wie dies wohl erstmals SMEDLEY-MACLEAN[2] gezeigt hat, die bei fettfrei ernährten Tieren hauptsächlich eine C_{20}-Triensäure, bei Linolsäuretieren Arachidonsäure antraf. Bei den Linolensäuretieren fanden HOLMAN et al.[26] Pentaen- und Hexaensäure vorherrschend.

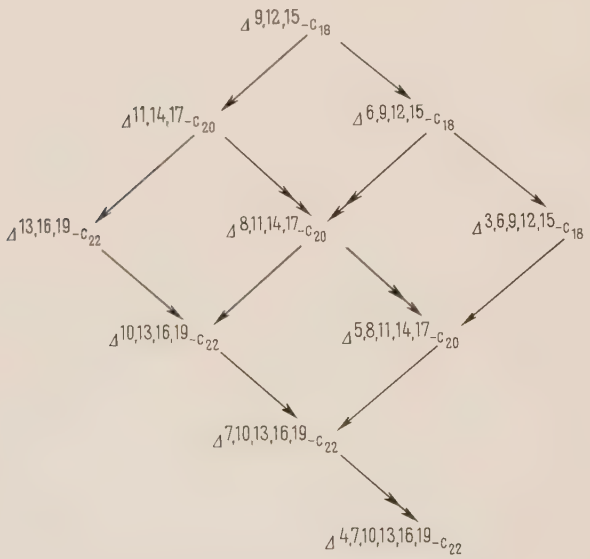
Bei unseren fettfrei ernährten Tieren findet sich in grössten Mengen eine C_{20}-Triensäure und ausserdem noch merkliche Mengen einer C_{20}-Tetraensäure. Bei den Linolsäuretieren ist die C_{20}-Triensäure fast ganz verschwunden. Statt dessen ist in grossen Mengen eine C_{20}-Tetraensäure vorhanden. Bei den Linolensäuretieren

[24] E. KLENK, Naturw. *41*, 68 (1954); Z. physiol. Chem. *302*, 268 (1955).
[25] E. KLENK und K. OETTE, Z. physiol. Chem. *318*, 86 (1960).
[26] C. WIDMER und R. T. HOLMAN, Arch. Biochem. *25*, 1 (1950).

Tab. II. Gehalt der Polyensäurefraktionen der Rattenphosphatide an C_{20}- und C_{22}-Polyensäuren in Mol%

	I fettfreie Grunddiät	II Grunddiät und Linolsäure	III Grunddiät und Linolensäure
C_{20}-Diensäure	Spur	Spur	Spur
C_{20}-Triensäure	28	5	10
C_{20}-Tetraensäure	15	40	7
C_{20}-Pentaensäure	Spur	Spur	18
C_{22}-Triensäure	0,5	—	Spur
C_{22}-Tetraensäure	1,5	6	—
C_{22}-Pentaensäure	—	—	2
C_{22}-Hexaensäure	2,5	6	21

findet man wieder in beträchtlichen Mengen die C_{20}-Triensäure, wenig Tetraensäure, aber nun besonders grosse Mengen einer C_{20}-Pentaensäure und einer C_{22}-Hexaensäure. Es sind dies die bereits erwähnten Polyensäuren vom Linolensäuretyp, die offensichtlich aus der verfütterten Linolensäure gebildet werden. Die C_{20}-Tetraensäure der Linolsäuretiere erwies sich als Arachidonsäure, eine Säure vom Linolsäuretyp, die ja aus Linolsäure gebildet wird. Bei den fettfrei ernährten Tieren wurde die C_{20}-Triensäure als $\Delta^{5,8,11}$-Eicosatriensäure identifiziert, in Bestätigung der Befunde von MEAD[27]. Die C_{20}-Tetraensäure enthielt ausser der Arachidonsäure auch die isomere $\Delta^{4,7,10,13}$-Eicosatetraensäure. Die Triensäure ist vom Ölsäuretyp, die Tetraensäure vom Palmitoleinsäuretyp. Sie werden möglicherweise durch Totalsynthese auf dem Weg über Ölsäure bzw. Palmitoleinsäure gebildet. Die letztere findet sich im Depotfett der Ratte in der Tat in reichlichen Mengen. Man gewinnt den Eindruck, dass die aus Linol- und Linolensäure der Nahrung gebildeten Polyensäuren



Schema für die Überführung von Linolensäure ($\Delta^{9,12,15}$-C_{18}) in die C_{20}- und C_{22}-Polyensäuren vom Linolensäuretyp. Linkslaufende Pfeile bezeichnen Kettenverlängerung um 2 C-Atome, rechtslaufende Pfeile die Einführung einer Doppelbindung in Richtung auf die Carboxylgruppe.

vom Linol- und Linolensäuretyp eine lebenswichtige Zellfunktion zu erfüllen haben und dass bei Mangeldiät Polyensäuren anderen Typs entstehen, welche durch Totalsynthese gebildet werden können und welche die ersteren bis zu einem gewissen Grad in ihrer Funktion zu ersetzen vermögen.

Nachdem die schon wiederholt erwähnten Untersuchungen von MEAD bereits weitgehend Aufschluss gebracht haben über die Bildung der Arachidonsäure aus Linolsäure, haben wir[28] versucht, nun den Bildungsmechanismus der C_{20}-Pentaen- und C_{22}-Hexaensäure aus Linolensäure etwas genauer zu studieren. Die Figur zeigt ein Schema, in dem alle Polyensäuren vom Linolsäuretyp enthalten sind, welche als theoretisch mögliche Zwischenprodukte bei der Bildung der C_{22}-Hexaensäure in Frage kommen.

Alle diese Polyensäuren sind in den Organphosphatiden, ebenso wie in den Fischölen, in der Tat auch vorhanden, mit Ausnahme der $\Delta^{3,6,9,12,15}$-Octadecapentaensäure, der $\Delta^{13,16,19}$-Docosatriensäure und der $\Delta^{10,13,16,19}$-Docosatetraensäure.

Es scheint, dass die Reaktionen vorzugsweise in folgender Richtung verlaufen: $\Delta^{9,12,15}$-$C_{18} \rightarrow \Delta^{6,9,12,15}$-$C_{18} \rightarrow \Delta^{8,11,14,17}$-$C_{20} \rightarrow \Delta^{5,8,11,14,17}$-$C_{20} \rightarrow \Delta^{7,10,13,16,19}$-$C_{22} \rightarrow \Delta^{4,7,10,13,16,19}$-$C_{22}$.

Durch *in vivo*-Versuche konnten die im Schema mit Doppelpfeil bezeichneten Übergänge experimentell bewiesen werden. Die Reaktionsgleichungen I–IV geben noch etwas genauer Aufschluss über die im einzelnen beobachteten Umsetzungen. In Reaktion I liegt eine Kettenverlängerung mit anschliessender Dehydrierung vor. Bei den Reaktionen II–IV werden nur neue Doppelbindungen eingeführt, und zwar in Richtung auf die Carboxylgruppe, so dass der Divinylmethanrhythmus erhalten bleibt.

I $\Delta^{6,9,12,15}$-Octadecatetraensäure-2-^{14}C → $\Delta^{5,8,11,14,17}$-Eicosapentaensäure-4-^{14}C

II $\Delta^{11,14,15}$-Eicosatriensäure-2-^{14}C → $\Delta^{5,8,11,14,17}$-Eicosapentaensäure-2-^{14}C

III $\Delta^{8,11,14,17}$-Eicosatriensäure-2-^{14}C → $\Delta^{5,8,11,14,17}$-Eicosapentaensäure-2-^{14}C

IV $\Delta^{7,10,13,16,19}$-Docosapentaensäure-2-^{14}C → $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$-Docosahexaensäure-2-^{14}C

Für diese Versuche wurden Polyensäuren verwendet, die in Stellung 2 mit ^{14}C markiert waren. Man verfütterte sie an Ratten und arbeitete nach einigen wenigen Stunden die Lebern auf Polyensäuren auf. Von den Abbaucarbonsäuren bestimmte man die Radioaktivität. In allen vier Versuchen fand sich über 90% der Gesamtaktivität der Polyensäurefraktion in den vom Carboxylende stammenden Dicarbonsäuren, und zwar enthält in den Versuchen I–III die Glutarsäure 57, 43 bzw. 53%, in Versuch IV die Bernsteinsäure 43% der Gesamtaktivität. Die in grösseren Mengen anfallende Malonsäure enthielt nur 2–6% der

[27] J. F. MEAD und W. H. SLATON jr., J. biol. Chem. *219*, 705 (1956).
[28] E. KLENK und H. MOHRHAUER, Z. physiol. Chem. *320*, 218 (1960).

Tab. III. Ergebnis des oxydativen Abbaus und spezifische Aktivitäten der Abbaudicarbonsäuren aus den Leberpolyensäuren von Wirbeltieren (Ausbeute in Mol/Mol Polyensäuren; Aktivität in Ipm/mg)

		Azelainsäure		Korksäure		Pimelinsäure		Adipinsäure		Glutarsäure		Bernsteinsäure		Malonsäure	
		Ausbeute	Aktivität	Ausbeute	Aktivität	Ausbeute	Aktivität	Ausbeute	Aktivität	Ausbeute	Aktivität	Ausbeute	Aktivität	Ausbeute	Aktivität
Ratte	1	—	—	—	—	—	—	—	—	0,24	1 000	0,15	600	0,71	50
Taube	1	—	3 380	—	5 640	—	3 320	—	—	0,12	4 733	0,08	2 800	0,58	103
	2	—	9 993	—	10 893	—	8 033	—	—	0,16	7 680	0,08	3 430	0,64	160
Schild-	1	0,39	117 500	0,06	112 770	0,08	40 090	0,07	25 240	0,22	13 010	—	—	0,56	403
kröte	2	0,39	132 500	0,06	104 835	0,10	57 420	0,08	39 165	0,22	29 480	—	—	0,53	580
Frosch	1	0,35	1 807	0,06	3 045	0,08	10 225	0,04	631	0,29	252	0,12	965	0,94	35
	2	0,33	3 897	0,06	5 160	0,07	18 825	0,06	1 115	0,23	757	0,11	1 740	0,75	60
Forelle	1	0,17	86 020	0,04	63 310	0,05	100 400	0,08	27 730	0,15	10 640	0,27	8 940	0,90	145
	2	0,20	75 330	0,06	63 210	0,06	91 490	0,09	27 700	0,22	9 360	0,30	8 460	1,22	98
Karpfen	1	0,23	20 620	0,06	20 530	0,07	53 890	0,07	15 690	0,14	6 516	0,23	19 000	0,86	67
	2	0,23	45 870	0,04	49 460	0,07	95 520	0,05	53 210	0,16	13 020	0,25	24 120	1,01	220
Flunder	1	0,21	1 076	0,05	1 012	0,07	2 124	0,05	605	0,21	183	0,19	366	0,87	17
	2	0,19	795	0,05	654	0,08	1 250	0,04	426	0,23	88	0,19	227	0,86	12
Scharbe	1	0,22	604	0,05	1 115	0,12	674	0,09	355	0,17	195	0,15	188	0,89	17
	2	0,23	676	0,05	820	0,13	470	0,09	175	0,17	111	0,12	86	0,84	12
Stint[a]	1	0,09	5 020	0,06	663	0,15	1 655	0,13	685	0,19	103	0,28	74	1,10	12
	2	—	—	0,07	532	0,09	1 410	0,05	665	0,32	110	0,36	63	1,92	3
Hering	1	—	—	—	—	—	—	—	—	0,12	3 375	0,17	572	1,14	45

[a] Versuch 1: Polyensäure aus Phosphatiden; Versuch 2: über Polybromide gereinigte Polyensäuren aus Triglyceriden.

Gesamtaktivität. Die Restaktivität verteilte sich auf alle übrigen Dicarbonsäuren. Alle diese Umsetzungen laufen offensichtlich mit erheblicher Geschwindigkeit ab. In keinem der Versuche konnten nennenswerte Mengen des unveränderten Ausgangsproduktes nachgewiesen werden. Als besonders bemerkenswert erscheint das Vorhandensein eines hochaktiven Fermentsystems in der Leber, durch welches die neuen Doppelbindungen in die Kohlenstoffkette der Fettsäuren eingeführt werden.

Als Versuchstiere zur Erforschung des Polyensäurestoffwechsels benützte man bisher fast ausschliesslich Ratten. Dasselbe gilt für die Untersuchungen über ihre Bedeutung als essentielle Fettsäuren. Nun fehlen diese C_{20}- und C_{22}-Polyensäuren im Depotfett der Säugetiere nahezu vollständig. In der absteigenden Wirbeltierreihe treten sie aber in zunehmendem Masse auch im Depotfett auf. Besonders bei den Seefischen sind sie ja darin sehr stark angereichert. Es wäre denkbar, dass der Polyensäurestoffwechsel bei diesen Tieren in ganz anderer Richtung verläuft. Wir[29] haben deshalb über die ganze Wirbeltierreihe hinweg vergleichende Versuche ausgeführt. Es wurde der Einbau von Acetat in die Polyensäuren der Leberlipoide studiert. Untersucht wurden die Lebern von Ratten, Tauben, Schildkröten, Fröschen und vor allem von Fischen, sowohl von Süsswasser- wie auch von Seefischen. Die Leberschnitte wurden in Ringerlösung mit ^{14}C-Acetat bebrütet und daraus die Fraktionen der Polyensäuren gewonnen. Aus Tabelle III ist die Ausbeute und spezifische Aktivität der Abbaudicarbonsäuren ersichtlich. Man sieht, dass der Einbau von Acetat nicht immer gleich gut ist, vor allem bei einigen Seefischen ist er verhältnismässig gering. Wahrscheinlich ist dies auf den hohen Fettgehalt dieser Lebern zurückzuführen, die sich wie das Fettgewebe verhalten dürften. Die Art des Einbaues erfolgt aber offensichtlich überall in derselben Weise. Die Aktivität findet sich durchwegs in den vom Carboxylende stammenden Dicarbonsäuren und die Aktivität der aus der Mitte der Kohlenstoffkette herausgespaltenen Malonsäure ist im Vergleich zu der der anderen Dicarbonsäuren sehr gering. Dabei ist zu beachten, dass die Azelainsäure in der Hauptsache aus Monoensäuren stammt, welche den Polyensäurefraktionen noch beigemengt sind.

Tabelle IV enthält die Ausbeute und die spezifische Aktivität der vom Methylende der Polyensäuren stammenden Bruchstücke. Sie wurden in Form der Aldehyde durch reduktive Ozonidspaltung erhalten. Man führte sie in die Dinitrophenylhydrazone über und trennte das Gemisch säulenchromatographisch in die Komponenten. Nachzuweisen war Nonanal, Heptanal, Hexanal und Propanal. Nonanal und Heptanal sind so gut wie ausschliesslich Abbauprodukte von Monoensäuren, insbesondere Ölsäure und Palmitoleinsäure. Ihre spezifische Aktivität ist ebenso hoch wie die der Azelainsäure, was auf eine Totalsynthese der Monoensäuren aus Acetat hinweist. Nur Hexanal und Propanal sind Abbauprodukte der Polyensäuren. Ihre spezifische Aktivität ist praktisch gleich Null, jedenfalls sehr gering im Vergleich zu der hohen Aktivität von Nonanal und Heptanal. Nirgendwo ergaben sich irgendwelche Anzeichen für die Totalsynthese der Polyensäuren. Vielmehr spricht alles dafür, dass sie im ganzen

[29] E. Klenk und G. Kremer, Z. physiol. Chem. *320*, 111 (1960).

Tab. IV. Ergebnis des reduktiven Abbaues und spezifische Aktivitäten der Dinitrophenylhydrazone der Abbaualdehyde aus den Leberpolyensäuren von Wirbeltieren (Ausbeute in Mol/Mol Polyensäuren, bezogen auf 100%; Aktivität in Ipm/mg)

		Nonanal		Heptanal		Hexanal		Propanal	
		Ausbeute	spezifische Aktivität	Ausbeute	spezifische Aktivität	Ausbeute	spezifische Aktivität	Ausbeute	spezifische Aktivität
Taube	1	—	—	—	—	—	30	—	5
	2	0,12	3 470	0,24	3 650	0,50	84	0,14	15
Schild-	1	0,06	44 400	0,17	81 750	0,41	325	0,36	184
kröte	2	0,06	36 750	0,21	84 630	0,38	473	0,35	212
Frosch	1	0,09	164	0,15	274	0,29	4	0,47	3
	2	0,07	285	0,13	496	0,32	16	0,48	8
Forelle	1	0,08	18 700	0,07	13 800	0,24	164	0,61	79
	2	0,05	17 500	0,04	11 800	0,26	129	0,65	33
Karpfen	1	0,04	10 600	0,08	11 120	0,12	120	0,76	83
	2	0,07	11 400	0,10	10 350	0,13	143	0,70	90
Flunder	1	0,06	402	0,12	542	0,08	48	0,74	0
	2	0,07	334	0,12	444	0,09	50	0,72	8
Scharbe	1	0,09	168	0,26	238	0,05	23	0,60	6
	2	0,09	194	0,22	256	0,05	19	0,63	5
Stint[a]	1	0,04	7 050	0,09	3 744	0,09	34	0,78	5
	2	—	—	—	—	—	—	0,98	0

[a] Versuch 1: Polyensäuren aus Phosphatiden;
Versuch 2: über Polybromide gereinigte Polyensäuren aus Triglyceriden

Wirbeltierstamm, und zwar auch bei den Seefischen, aus exogenen Vorstufen von der Art der Linol- und Linolensäure durch Kettenverlängerung und Dehydrierung entstehen.

Besonders hinzuweisen ist noch auf die auffallende Verschiebung des Verhältnisses von Hexanal und Propanal in der absteigenden Wirbeltierreihe. Die Menge des Hexanals nimmt stark ab, die Menge des Propanals nimmt demgegenüber stark zu, das heisst, in der absteigenden Wirbeltierreihe treten die Polyensäuren vom Linolsäuretyp immer mehr zurück, bis schliesslich der Linolensäuretyp stark überwiegt.

Der heutige Stand unserer Kenntnisse des Stoffwechsels der Polyenfettsäuren lässt sich in wenigen Sätzen zusammenfassen. Wenn auch die Totalsynthese der Monoensäuren auf dem Wege über die gesättigten Fettsäuren als gesichert anzusehen ist, so kann andererseits auch kein Zweifel darüber bestehen, dass die Einführung einer zweiten Doppelbindung in die Kohlenstoffkette offensichtlich dem Organismus gewisse Schwierigkeiten macht. Nur wenn zwei oder drei Doppelbindungen in geeigneter Stellung schon vorhanden sind, vollzieht sich die Einführung weiterer Doppelbindungen sehr leicht. Sie erfolgt stets in Richtung auf die Carboxylgruppe unter Beibehaltung des schon vorgegebenen Divinylmethanrhythmus. Dabei kann die Doppelbindung nicht näher als in Stellung 4 an die Carboxylgruppe herantreten. Eine darüber hinausgehende Anhäufung von Doppelbindungen ist nur möglich nach vorangegangener Verlängerung der Kohlenstoffkette auf der Seite der Carboxylgruppe um jeweils zwei Kohlenstoffatome, so dass die C_{18}-Tetraensäure in eine C_{20}-Pentaensäure und diese wieder in die C_{22}-Hexaensäure übergeht.

Da Linol- und Linolensäure normalerweise in der Nahrung der Tiere immer vorhanden sein dürften, erklärt sich damit das fast ausschliessliche Auftreten von Polyensäuren des Linol- und Linolensäuretyps im Organfett aller Wirbeltiere und bei Kaltblütern auch im Depotfett. Trotzdem scheint unter gewissen Bedingungen die Möglichkeit der Totalsynthese von Polyensäuren gegeben. In diesem Fall aber werden Polyensäuren anderen Typs gebildet.

Was nun die Frage des oxydativen Abbaus der Polyensäuren betrifft, so kann ich mich hier sehr kurz fassen. Wir wissen darüber nur so viel, dass sie im Organismus mindestens ebenso leicht wie die gesättigten Fettsäuren verbrannt werden, wie dies aus Befunden von BERNHARD[30] und anderen hervorgeht. Wie dieser Abbau im einzelnen erfolgt, ist noch völlig unbekannt. Es mag sein, dass die Bildung der höchstungesättigten Polyensäuren, in welchen die Doppelbindungen schliesslich gleichmässig über die ganze Kohlenstoffkette hinweg verteilt sind, bereits der erste Schritt zum oxydativen Abbau ist. Aber dies ist vorläufig nur reine Spekulation. Noch wissen wir nicht, an welcher Stelle das Experiment ansetzen muss, um das Problem zu lösen.

Summary. The chemical structure of the polyenoic fatty acids occuring in organ phosphatides and in fish oils is reviewed. The double bonds of all these polyenoic acids are arranged in divinylmethane pattern. Except some of the C_{16}-polyenoic acids of fish oils, these polyenoic acids belong either to the oleic, linoleic or linolenic acid type and have chain lengths C_{18}, C_{20}, and C_{22}. Polyenoic acids of the oleic acid type are present only in small amounts in phosphatides of mammalian origin. Fish oils are lacking in these but predominantly contain polyenoic acids of the linolenic acid type.

Metabolic studies have shown that polyenoic acids of linoleic acid type (e.g. arachidonic acid) originate from linoleic acid and those of the linolenic acid type (e.g. C_{20}-pentaenoic and C_{22}-hexaenoic acid) from linolenic acid—both supplemented exogenous—by extension of the carbon chain by acetate on the side of the carboxylic acid group and introduction of additional double bonds in the divinylmethane pattern directed toward the carboxylic acid group. There is some evidence, however, that a total synthesis of the polyenoic acids of the oleic acid type occurs in the animal body.

The transformation of linolenic to C_{22}-hexaenoic acid and some intermediate reactans have been investigated more precisely by means of the tracer method. As far as the biosynthesis of the polyenoic fatty acids is concerned there are no fundamental differences in different vertebrates.

[30] K. BERNHARD, M. ROTHLIN, J. P. VUILLEUMIER und R. WYSS, Helv. chim. Acta *41*, 1017 (1958).

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions experimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Vergleichende Untersuchungen über die Dekorporationseffektivität einiger neuerer Chelatbildner

Wird bei Chelatbildnern die Zahl der Elektronendonorgruppen vermehrt, so kann dies zu einer Erhöhung der Stabilität der Chelate mit 3- und mehrwertigen Metallionen und damit auch der Dekorporationseffektivität führen. Die 6zähnige Äthylendiamin-NNN'N'-tetraessigsäure (I) ist beispielsweise weniger wirksam als die 7zähnige ββ'-Diaminodiäthyläther-NNN'N'-tetraessigsäure (II)[1,2] und die 8- bzw. 10zähnige Diäthylentriamin-NNN'N'N''-pentaessigsäure (III)[1–8] und Triäthylentetraamin-NNN'N'N''N'''-hexaessigsäure(IV)[9,10]. Daneben spielt aber auch die Art der Donorgruppen eine entscheidende Rolle, indem zum Beispiel die ebenfalls 8zähnige Äthylenglykol-bis-(β-aminoäthyläther)-NNN'N'-tetraessigsäure (V) in ihrer Effektivität der III unterlegen ist[1]. Die vorliegende Untersuchung über die Dekorporation von Radiocer durch die oben angeführten und einige neuere Polyaminopolycarboxylsäuren stellt einen Beitrag zur Frage dar, inwieweit die Molekülkonfiguration und Substitutionen am Liganden dessen Effektivität beeinflussen. Wird in der I eine Acetatgruppe durch einen Cyclohexylring ersetzt, so erhält man die ebenfalls 6zähnige N'-(2-Hydroxycyclohexyl)äthylendiamin-N'NN-triessigsäure (VI). Der Ersatz einer Äthylengruppe in II und III durch einen Cyclohexylring ergibt die 2-(β-Aminoäthoxy)-cyclohexylamin-NNN'N'-tetraessigsäure (VII) bzw. N-[(2-Dicarboxymethylamino)cyclohexyl]-äthylendiamin-NN'N'-triessigsäure (VIII). Die gleiche Zahl und Art der Donorgruppen wie V zeigen die 1,2-Propylenglykol-bis-(β-aminoäthyläther)-NNN'N'-tetraessigsäure (IX), 2,3-Butylenglykol-bis-(β-aminoäthyläther)-NNN'N'-tetraessigsäure (X) und 1,4-Butylenglykol-bis-(β-aminoäthyläther)-NNN'N'-tetraessigsäure (XI). Die ββ'β''-Triaminotriäthylamin-NNN'N'N''N'''-hexaessigsäure (XII) und 1,2,3-Triaminopropan-NNN'N'N''N''-hexaessigsäure (XIII) sind durch eine von IV abweichende Ligandengruppierung gekennzeichnet. Die weiterhin untersuchte 12zähnige Tetraäthylenpentaamin-NNN'N'N''N'''N''''-heptaessigsäure (XIV) enthielt nicht näher bestimmbare Verunreinigungen an Homologen.

7–9 Wochen alte Ratten mit einem mittleren Gewicht von 155 g wurden intravenös mit je 1 μC trägerfreiem $^{144}CeCl_3$ (pH 3) und anschliessend oder nach 3 Tagen intraperitoneal mit je 250 μ*M* der Calcium-Natrium-Chelate der Polyaminosäuren injiziert. Der ^{144}Ce-Gehalt der Organe wurde in % der entsprechenden Kontrollwerte bei unbehandelten Tieren ausgedrückt.

Bei frühzeitiger Verabfolgung (Tab. I) zeigen die Analogen der III, IV und V gegenüber den Ausgangssubstanzen keine Erhöhung der Effektivität oder sogar, wie im Falle der XI und XIII, eine eindeutige Verschlechterung, wobei sich die Effektivitätsunterschiede allgemein in stärkerem Masse im Skelett manifestieren. Die VII erwies sich im Vergleich zu II in zwei unabhängigen Versuchen als wirksamer. Besonders hervorzuheben ist, dass die VI eine erheblich stärkere Lebereffektivität zeigt, als auf Grund der fehlenden Wirksamkeit im Skelett hätte erwartet

Tab. I. ^{144}Ce-Verteilung nach Verabreichung verschiedener Chelatbildner (Organgehalt in % der Kontrollwerte mit Mutungsbereich für $P = 0{,}05$). Die Chelatbildner wurden unmittelbar nach Injektion von ^{144}Ce i.p. verabreicht. Sektion am 4. Tag. *N* = Anzahl der Tiere.

Chelatbildner	*N*	Leber	Nieren	Skelett
I	8	30 (22 –40)	36 (30–45)	112 (97 –130)
VI	10	6,2 (5,0 – 7,8)	34 (29–40)	128 (112 –145)
II	12	20 (14 –28)	24 (16–35)	35 (25 – 50)
VII	13	3,4 (2,4 – 4,8)	22 (15–32)	28 (22 – 35)
II	7	10 (6,7 –16)	30 (22–43)	40 (21 – 74)
VII	7	5,1 (3,3 – 8,0)	33 (23–46)	29 (16 – 53)
III	12	1,2 (0,84– 1,7)	19 (13–28)	8,2 (6,4– 11)
VIII	12	1,3 (0,93– 1,9)	20 (14–29)	14 (11 – 17)
IV	11	2,4 (1,9 – 3,0)	15 (11–21)	6,0 (4,6– 8,0)
XII	12	21 (16 –27)	25 (18–34)	27 (20 – 36)
XIII	10	27 (22 –33)	28 (21–37)	101 (77 –132)
V	10	16 (11 –23)	23 (16–34)	62 (52 – 71)
IX	10	13 (9,2 –19)	29 (20–41)	68 (58 – 80)
X	10	12 (8,1 –18)	35 (24–51)	83 (71 – 98)
XI	10	55 (38 –79)	51 (35–74)	115 (98 –136)
XIV	8	4,2 (3,6 – 4,8)	22 (17–29)	23 (20 – 25)

Tab. II. ^{144}Ce-Verteilung nach Verabreichung verschiedener Chelatbildner (Organgehalt in % der Kontrollwerte mit Mutungsbereich für $P = 0{,}05$). Die Chelatbildner wurden am 3. Tag nach Injektion von ^{144}Ce i.p. verabreicht. Sektion am 7. Tag. *N* = Anzahl der Tiere.

Chelatbildner	*N*	Leber	Nieren	Skelett
VI	10	67 (59– 76)	93 (77–112)	101 (88–115)
II	14	103 (88–121)	95 (71–128)	83 (73– 94)
VII	14	95 (81–112)	96 (71–129)	88 (77– 99)
III	13	28 (23– 33)	86 (63–117)	72 (62– 82)
VIII	13	65 (55– 78)	77 (56–105)	75 (66– 86)
IV	12	55 (48– 63)	86 (68–109)	75 (67– 84)
XII	13	100 (87–115)	119 (93–151)	108 (96–129)
XIII	13	86 (81– 96)	115 (91–146)	92 (83–104)
V	14	79 (63– 99)	84 (61–115)	95 (81–110)
IX	14	89 (71–112)	87 (63–117)	97 (84–113)
X	14	74 (59– 93)	93 (68–127)	99 (85–115)
XI	14	106 (85–132)	104 (76–142)	99 (85–115)

[1] A. Catsch und D. Kh. Lê, Strahlenther. *104*, 609 (1957).
[2] J. F. Fried, E. H. Graul, J. Schubert und W. M. Westfall, Atompraxis *5*, 1 (1959).
[3] V. H. Smith, Nature *181*, 1792 (1958).
[4] A. Catsch und H. Melchinger, Strahlenther. *107*, 437 (1958).
[5] H. Foreman, in *Metal-Binding in Medicine* (Philadelphia und Montreal 1960), p. 160.
[6] J. F. Fried, A. Lindenbaum und J. Schubert, Fed. Proc. *18*, 229 (1959).
[7] A. Catsch, Klin. Wschr. *1959*, 657.
[8] F. D. Sowby und D. M. Taylor, Nature *187*, 612 (1960).
[9] A. Catsch und D. Schindewolf-Jordan, Nature, im Druck.
[10] A. Catsch und G. P. Tocchini-Valentini, Strahlenther., im Druck.

werden können. Die Ursache dürfte darin zu suchen sein, dass die VI teilweise als Lakton vorliegt; veresterte Chelatbildner bzw. solche mit Laktongruppen zeigen jedoch auf Grund ihrer Anreicherung im intracellulären Raum eine besonders stark ausgeprägte Lebereffektivität[11]. Der Vergleich von XIV und III zeigt, dass der Vermehrung der Donorgruppen durchaus nicht immer eine Effektivitätserhöhung zu entsprechen braucht; die Bildung weniger stabiler bimetallischer Chelate dürfte allerdings im Fall der XIV nicht mehr zu vernachlässigen sein. Bei später Verabfolgung (Tab. II) zeigen alle Chelatbildner einen ausgeprägten Effektivitätsverlust. Auffallend ist jedoch, dass die V und ihre Analogen IX und X in diesem Falle eine stärkere Reduktion des ^{144}Ce-Gehalts der Leber bewirken als die bei frühzeitiger Verabreichung wirksameren II und VII. Da im Moment weder Chelatstabilitätskonstanten noch Daten über das Verhalten der in Frage stehenden Liganden im Stoffwechsel zur Verfügung stehen, kann auch noch keine plausible Erklärung für diese Diskrepanz vorgeschlagen werden.

Die an Radiocer erhobenen Befunde können natürlich, wie wir bereits früher betonten[4], nicht ohne weiteres auf andere Elemente übertragen werden. Besonders interessant dürfte es sein, die Effektivität der hier geprüften Substanzen, vor allem der VII, für Plutonium zu untersuchen, und zwar aus folgendem Grund: II und III zeigen bei Plutonium im Gegensatz zu Radiocer keine Effektivitätsunterschiede[2]. Würde die für Radiocer im Vergleich zu II höhere Wirksamkeit der VII auch für Plutonium ihre Gültigkeit behalten, so könnte dies einen gewissen Fortschritt für die Therapie der Plutoniuminkorporation darstellen[12].

Summary. The influence of several new polyaminopolycarboxylic acids on the distribution of carrierfree radiocerium in the organs of the rat was studied. Some theoretical and practical implications of the experimental findings are discussed.

A. CATSCH und D. SCHINDEWOLF-JORDAN

Institut für Strahlenbiologie am Kernforschungszentrum Karlsruhe (Deutschland), 4. Januar 1961.

[11] A. CATSCH, Int. J. appl. Radiat. Isotop., im Druck.

[12] Für die Überlassung der Substanzen danken wir der J. R. Geigy A.G., Basel.

Die Totalsynthese des Ergotamins[1]

Ergotamin wurde 1918 von A. STOLL entdeckt und als erstes einheitliches Mutterkornalkaloid in reinem Zustand dargestellt und beschrieben[2]. Später konnte auf Grund von Abbaureaktionen für diesen Naturstoff die Strukturformel I abgeleitet werden[3,4]. Diese setzt sich aus dem Lysergsäure-Rest und dem Peptidteil zusammen. Die Lysergsäure konnte 1954 totalsynthetisch hergestellt werden[5]. Der Peptidteil stellt, gemäss Arbeiten, welche in unseren Laboratorien ausgeführt worden sind[4], ein cyclisches Tripeptid dar, das als besondere Strukturelemente eine säureamid- und esterartig substituierte Orthocarbonsäure- und eine sehr labile α-Hydroxy-α-amino-Gruppierung aufweist. Diese Cyclol-Struktur gab indessen immer wieder Anlass zu weiteren Untersuchungen und Diskussionen[6]. Nachstehend berichten wir nun über die Totalsynthese des Ergotamins, wodurch dessen Strukturformel I bestätigt wird.

L-Phenylalanyl-*L*-prolin-lactam (III; Smp. 133°; $[\alpha]_D^{20} = -83°$ (c = 0,2 in Wasser))[7] wurde mit *d,l*-Methylbenzyloxy-malonsäurehalbester-chlorid (II; $Kp_{0.03}$ = 138–141°; n_D^{20} 1,5150; $C_{13}H_{15}O_4Cl$, ber. C 57,7%, H 5,7%, O 23,6%, Cl 13,1%; gef. C 57,4%, H 5,4%, O 23,7%, Cl 13,8%)[8] acyliert. Man erhielt zwei diastereoisomere Acylierungsprodukte, die nach hydrogenolytischer Spaltung der Benzyloxy-Gruppe spontan zu den Verbindungen der Formel IVa ($R = -COOC_2H_5$; Smp. 135–136°; $[\alpha]_D^{20}$ –34° (c = 0,2 in Pyridin); $C_{20}H_{24}O_6N_2$: ber. C 61,8%, H 6,2%, O 24,7%, N 7,2%; gef. C 61,9%, H 6,3%, O 24,9%, N 7,2%) bzw. IVb ($R = -COOC_2H_5$; Smp. 202–204°; $[\alpha]_D^{20}$ –35° (c 1,0 in Pyridin); $C_{20}H_{24}O_6N_2$: ber. C 61,8%, H 6,2%, O 24,7%, N 7,2%; gef. C 62,1%, H 6,3%, O 24,5%, N 7,2%) cyclisierten und sich durch fraktionierte Kristallisation trennen liessen. Die Cyclol-Struktur in IVa/b liess sich aus dem Vorliegen einer sauren Hydroxyl-Gruppe und aus anderen physikalischen und chemischen Befunden eindeutig ableiten.

Durch Verseifung der Äthylester-Gruppierung der Verbindung IVa wurde die Säure V ($R = -COOH$; Smp. 120–122°; $[\alpha]_D^{20} = -10°$ (c = 0,2 in Pyridin); $C_{18}H_{20}O_6N_2$: ber. C 60,0%, H 5,6%, O 26,6%, N 7,8%; gef. C 60,0%, H 5,9%, O 27,3%, N 7,6%) erhalten, deren Natriumsalz mit Oxalylchlorid umgesetzt das entsprechende Säurechlorid VI ($R = -COCl$; Smp. 125–126°; $C_{18}H_{19}O_5N_2Cl$: ber. C 57,1%, H 5,0%, Cl 9,4%; gef. C 57,4%, H 5,3%, Cl 8,6%) lieferte. Dieses wurde mit Natriumazid ins Säureazid VII ($R = -CON_3$; Smp. ca. 100° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -42°$ (c = 0,3 in Pyridin); $C_{18}H_{19}O_5N_5$: ber. C 56,1%, H 5,0%, O 20,8%, N 18,2%; gef. C 56,9%, H 5,2%, O 21,8%, N 16,8%) übergeführt. Durch Curtiusschen Abbau in Benzylalkohol konnte die Carbobenzoxy-amino-Verbindung VIII ($R = -NHCOOCH_2C_6H_5$; Smp. 172–173°; $[\alpha]_D^{20} = -4°$ (c = 0,3 in Pyridin); $C_{25}H_{27}O_6N_3$: ber. C 64,5%, H 5,8%, O 20,6%, N 9,0%; gef. C 64,7%, H 5,9%, O 20,5%, N 9,0%) erhalten werden. Der Peptidteil des Ergotamins wurde nun aus der Verbindung VIII durch katalytische Hydrierung in salzsaurer, methanolischer Lösung, mit Palladium als Katalysator, als Hydrochlorid erhalten (IX; $R = -NH_2 \cdot HCl$; Smp. 180–183°; $C_{17}H_{22}O_4N_3Cl$: ber. C 55,5%, H 6,0%, O 17,4%, N 11,4%, Cl 9,7%; gef. C 55,5%, H 6,0%, O 18,1%, N 11,2%, Cl 9,6%). Die Verknüpfung von IX mit Lysergsäurechlorid-hydrochlorid[9], durchgeführt in Chloroform mit Tributylamin, lieferte synthetisches Ergotamin, das sich mit dem natürlichen Mutterkornalkaloid im optischen

[1] 50. Mitteilung über Mutterkornalkaloide. 49. Mitt. s. Exper. *17*, 108 (1961).

[2] Schweiz. Pat. Nr. 79879 (1918); vgl. A. STOLL, Helv. chim. Acta *28*, 1283 (1945).

[3] S. SMITH und G. M. TIMMIS, J. chem. Soc. *1932*, 1543; W. A. JACOBS und L. C. CRAIG, Science *81*, 256 (1935); J. org. Chem. *1*, 245 (1937).

[4] A. STOLL, A. HOFMANN und TH. PETRZILKA, Helv. chim. Acta *34*, 1544 (1951).

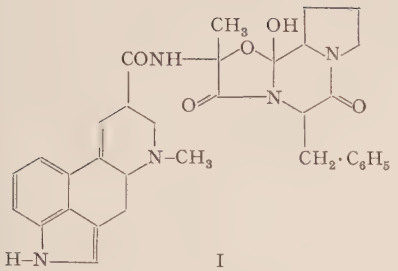
[5] E. C. KORNFELD et al., J. Amer. chem. Soc. *76*, 5256 (1954).

[6] C. A. GROB u. W. MEIER, Helv. chim. Acta *39*, 776 (1956); W. K. ANTONOV, G. A. RAVDEL und M. M. CHEMIAKINE, Chimia *14*, 374 (1960).

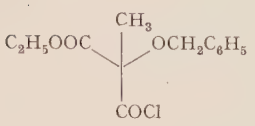
[7] R. E. NEUMAN und E. L. SMITH, J. biol. Chem. *193*, 108 (1951).

[8] Hergestellt durch Umsetzen von Brom-methyl-malonsäure-diäthylester mit Natriumbenzylat, Verseifung zum Halbester und Reaktion mit Thionylchlorid.

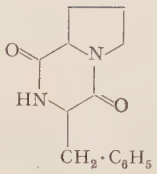
[9] Schweiz. Patentanmeldung Nr. 11 132.



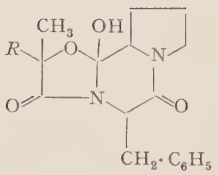
I



II



III



IV a/b – IX

Drehvermögen, Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, UV- und IR-Spektrum, im chromatographischen Verhalten und im pharmakologischen Test als vollkommen identisch erwies.

Die ausführliche Publikation wird später in den Helv. chim. Acta erscheinen.

Summary. The total synthesis of the Ergot alkaloid Ergotamine is described.

A. Hofmann, A. J. Frey und H. Ott

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium, Sandoz A.G., Basel, 17. April 1961.

Natural Chromatography and the Accumulation of Petroleum in Rocks in View of Analyses of Bitumen from the Athabasca Deposit in Canada

Petroleum is the only organic liquid which occurs in sedimentary rocks in significant quantities. Petroleum consists mainly of hydrocarbons; whereas its ultimate source, the organic matter in marine sediments, is composed of small quantities of a large variety of different compound types. It is known that fluids, mainly water solutions, flow within sedimentary rocks, percolating through the maze of capillary pores. Colloidal mineral particles in the pores may selectively filter out polar compounds from the flowing fluids.

Figure 1 shows a photomicrograph of a thin section of a common, graywacke type sandstone, prepared from a drill core from the Woodbine formation of East Texas, taken from a depth of approximately 4800 feet. The clay mineral aggregates are visible in the pore channel. Laboratory chromatographic columns and sandstones often have similar compositions and textures.

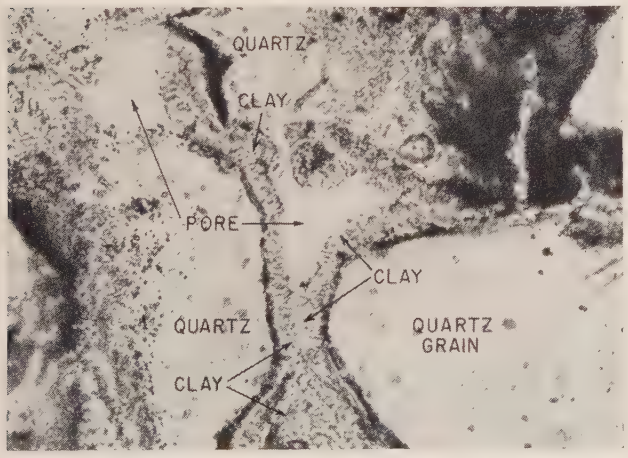


Fig. 1. Photomicrograph of a thin section of a sandstone. Woodbine formation, East Texas. Depth approximately 4800 feet, Magnification approximately 300×.

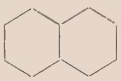
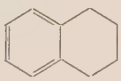
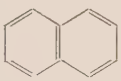
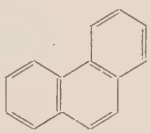
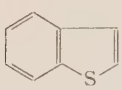
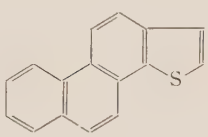
It has been long known that beds of clay minerals act as selective filters removing asphaltic and polar substances from petroleum[1]. It is also known that certain non-hydrocarbon constituents may be preferentially distributed in petroleum deposits[2,3] in a pattern which resembles chromatographic bands. It was found in the laboratory that among a group of organic compounds the hydrocarbons move with the least restraint through clay packed columns[4]. Furthermore, organic ions have been eluted in quartz sand and clay columns with sea water only[5], in accordance with the chromatographic principles of Martin and Synge[6]. The chromatographic 'plate' theory can be used to predict the movement of the bands in beds of sand and clay[7]. Consequently, one may conclude that chromatography is both a laboratory process and a natural phenomenon.

The Table lists some of the components of the semi-solid Athabasca bitumen from northeastern Alberta (Canada). This analysis[8] further substantiates the fact that this is the largest known petroleum deposit. Geological field relationships show that the petroleum in the Athabasca deposit was brought into its present resting place by percolating fluids. These two observations, together with the fact that most of the bituminous sandstones lie exposed on the surface, make the Athabasca deposit well suited for a study in natural chromatography.

The saturated hydrocarbon content of approximately 100 bituminous rock samples was determined. The samples came from three bore holes from the northeastern part of the deposit; the two holes which were the farthest were approximately 40 miles apart. If fluid flow was operational for a prolonged period of time, the chromatographic concept requires that the saturated hydrocarbons be evenly distributed over a large area in the deposit. This was found to be the case, because the saturated hydrocarbon contents of the samples showed only minor variations.

[1] J. E. Gilpin and M. P. Cram, Amer. Chem. J. *40*, 495 (1908).
[2] L. C. Bonham, Bull. AAPG *40*, 897 (1956).
[3] G. W. Hodgson and B. L. Baker, Bull. AAPG *43*, 311 (1959).
[4] C. E. Legate, Bull. GSA *69*, 1603 (1958).
[5] B. Nagy and J. P. Wourms, Bull. GSA. *70*, 655 (1959).
[6] A. J. P. Martin and R. L. M. Synge, Biochem. J. *35*, 1358 (1941).
[7] B. Nagy, Geochim. cosmochim. Acta *19*, 289 (1959).
[8] B. Nagy and G. C. Gagnon, Geochim. cosmochim. Acta, in print.

Composition of the Athabasca petroleum from the Abasand Quarry, in the vicinity of McMurray, Alberta (Canada)

Constituent	Type	Amount	Method of Analysis
Total petroleum[a]	glossy, brownish-black, semi-solid organic matter	16.47 weight% of dry rock	extraction with CH_2Cl_2 at room temperature
Asphaltenes	colloidal particles in the petroleum	22.3 weight% of total petroleum	precipitation and digestion with *n*-pentane
Saturated hydrocarbons	*n*-paraffins, *iso*-paraffins and naphthenes	approx. 11 weight% of total petroleum	elution chromatography mass spectrometry
n-Paraffins	————	approx. 1 weight% of saturated hydrocarbons	elution chromatography, urea adduction, ultraviolet spectroscopy
Monocyclic naphthenes		relatively common	elution chromatography mass spectrometry
Condensed naphthenes		common constituents	elution chromatography mass spectrometry
Alkyl benzenes		common constituents	elution chromatography mass spectrometry
Cyclo-alkyl benzenes		common constituents	elution chromatography mass spectrometry
Naphthalenes		present in sample	elution chromatography mass spectrometry
Phenanthrenes		present in sample	elution chromatography mass spectrometry
Pyridines		possible constituents	elution chromatography mass spectrometry
Benzothiophenes		possible constituents	elution chromatography mass spectrometry
Thiophenophenanthrenes		possible constituents	elution chromatography mass spectrometry

[a] An elementary analysis of the petroleum gave the following results: C = 80.10%; H = 10.68%; N = 0.54%; S = 6.63%; O (by difference) = 2.05%; C/H = 0.63.

To be able to use the Athabasca deposit for a study of natural chromatography, one must account for the presence of the asphaltene colloids in the petroleum. The colloids seem to be chiefly responsible for the high viscosity of the petroleum. Some of the colloidal particles and/or their aggregates are too large to have flowed through the smaller pores in shales and sandstones. Asphaltenes can be separated from petroleum[9], but their sizes and molecular weights vary, depending on the environment and on the means of study[10]. It is known that asphalt can be prepared from petroleum residues by air oxidation. Figure 2 illustrates such an effect, using crude petroleum in a simulated geological environment. The asphaltene colloids are, apparently, the products of chemical reactions taking place after the petroleum reached its reservoir.

The concept of natural chromatography may help to explain the accumulation of petroleum even when the exact origin of petroleum components is still being debated. It points to the preferential accumulation of

[9] P. A. WITHERSPOON, Report of Investigations *206*, Illinois State Geol. Survey (1958).

[10] R. S. WINNIFORD, Preprint, Div. Pet. Chem. ACS *5*, A-11 (1960).

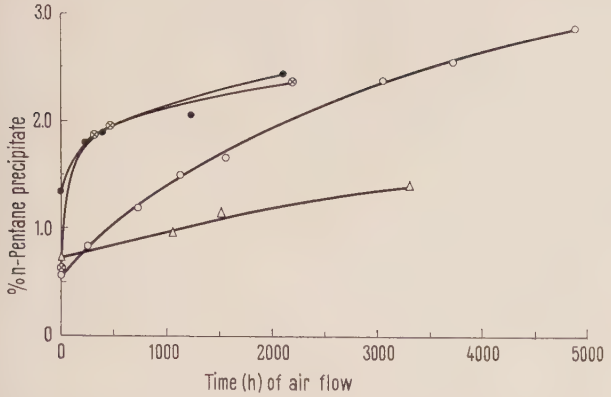


Fig. 2. The development of asphaltic matter in petroleum by prolonged exposure to air. Asphaltenes were determined by precipitation with *n*-pentane. Temperature: 50° ± 1°C; rate of air flow: approx. 2.5 ml air/min/ml of liquid crude oil; ○ crude oil, Perry, Oklahoma; △ crude oil, Pembina Field, Alberta; • crude oil, Perry, Oklahoma, with 0.1% surface active agent added (Poly-Tergent B-300, Olin Mathieson Co., ethoxylated nonyl phenol, containing 9–10 moles of ethylene oxide); ⊗ crude oil, Perry, Oklahoma, with 5 weight % colloidal sulfur added.

hydrocarbons in rocks, regardless of whether they were synthesized in 'source rocks'[11] or derived with minor alterations only from living matter[12,13].

Résumé. La matière organique contenue dans les sédiments récents offre une grande variété de composants. Le pétrole, cependant, est constitué essentiellement d'hydrocarbures. Le déplacement des fluides dans les roches se traduit par une chromatographie, où les particules colloïdales séparent sélectivement de la phase mobile les composants polaires. La répartition des hydrocarbures saturés dans une partie du gisement de l'Athabasca, au Canada, répond à la notion de chromatographie naturelle.

B. Nagy[14] and Josefina Lugay

Department of Chemistry, Fordham University, New York, October 20, 1960.

[11] G. T. Philippi, Preprints, 42nd Annual Meeting AAPG. *36*, (1957).
[12] W. G. Meinschein, Bull. AAPG. *43*, 925 (1959).
[13] E. G. Baker, Science *129*, 871 (1959).
[14] The work which is reported here is sponsored by the National Science Foundation.

Voacanga-Alkaloide V[1]. Verknüpfung von Vobasin mit Dregamin und Tabernaemontanin

Vobasin, $C_{21}H_{24}N_2O_3$, ein Nebenalkaloid aus der Stammrinde von *Voacanga africana* Stapf[2], gehört dem gleichen Spektraltyp an wie Tabernaemontanin, $C_{20}H_{26}N_2O_3$ [3] oder $C_{21}H_{28}N_2O_3$ [4], Voacafrin, $C_{22}H_{26}N_2O_4$, Voacafricin, $C_{22}H_{24}N_2O_4$ [5] und Dregamin, $C_{21}H_{28}N_2O_3$ [6]. Als Chromophor wurde in diesen Stoffen ein Strukturelement der Art eines 2-Phenyl-indols[2] oder eines 2-Acyl-indols[4] vermutet.

Im Vobasin konnte nun eine dem 2-Acylindol entsprechende konjugierte Carbonylgruppe nachgewiesen werden: Vobasin bildet ein granatrotes *2,4-Dinitrophenylhydrazon*, $C_{27}H_{28}N_6O_6$ [7], Smp. 172–175° (Zers.), dessen langwellige UV-Absorption (λ_{max}^{MeOH} 217,5; 317 und 413 mμ; log ε 4,43; 3,96 und 4,13) und dessen IR-Spektrum (in CH_2Cl_2 Banden bei 3,03 (NH) und 6,20 (C=N) μ) auf eine stark konjugierte Ketimingruppierung hinweisen. Reduktion von Vobasin mit Kaliumborhydrid führt zu *Vobasinol*, $C_{21}H_{26}N_2O_3$ [7], Smp. 100–102° (Solvat), dessen UV-Spektrum demjenigen eines nicht konjugierten 2,3-Dialkylindols entspricht (λ_{max}^{MeOH} 224; 279; 285 und 294 mμ; log ε 4,48; 3,89; 3,90 und 3,85). Die neuentstandene Hydroxylgruppe ist im IR-Spektrum nicht erkennbar, lässt sich aber durch Acetylierung nachweisen: *O-Acetylvobasinol*, $C_{23}H_{28}N_2O_4$ [7], Smp. 160–162°, im IR-Spektrum (KBr) Acetylbanden bei 5,73 (CO-Acetat), 8,15 und 9,75 mμ.

Vobasin enthält eine C-Methyl-[2], aber keine C-Äthylgruppe (Mikrochromsäure-Oxydation). Durch Mikrohydrierung[2] sind in Vobasin zwei ungesättigte Gruppierungen nachweisbar, wovon eine mit der Ketogruppe identisch ist. Die andere entspricht einer Äthylenfunktion, die durch selektive Hydrierung abgesättigt werden kann: in Abhängigkeit vom verwendeten Katalysator entsteht aus Vobasin unter Aufnahme von 1 Mol H_2 entweder in nahezu einheitlicher Reaktion Dregamin[8], oder aber ein Gemisch aus Dregamin und Tabernaemontanin (Smp. 215–216°, $[\alpha]_D^{22} = -58°$ in $CHCl_3$), aus dem die reinen Alkaloide[9] durch Gegenstromverteilung und/oder fraktionierte Kristallisation abgetrennt werden können. In Dregamin wie in Tabernaemontanin ist eine C-Methylgruppe als Teil einer C-Äthylgruppierung nachweisbar. Somit ist in Vobasin an der entsprechenden Stelle eine Äthylidengruppe vorhanden. In Übereinstimmung mit der durch zahlreiche Derivate gesicherten Summenformel des Vobasins ergeben die Analysen der Dihydroderivate Dregamin und Tabernaemontanin die Zusammensetzung $C_{21}H_{26}N_2O_3$ [7]. Es darf angenommen werden, dass sich diese beiden Alkaloide nur in der räumlichen Lage ihrer Äthylseitenketten unterscheiden.

Während Vobasin bis heute nur in *V. africana* und Tabernaemontanin nur in *Ervatamia coronaria*[3,4,10] gefunden wurden, konnte Dregamin sowohl in *E. coronaria*[4] wie auch in *V. dregei* E.M.[6] festgestellt werden.

Summary. Chemical proof is adduced for the 2-acylindole moiety in vobasine. Reduction of the ethylidene moiety present in vobasine furnishes the diastereomeric 2-acylindole alkaloids dregamine and tabernaemontanine, whose correct molecular composition, $C_{21}H_{26}N_2O_3$, is thus established.

U. Renner und D. A. Prins[11]

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. Geigy A.G., Basel, 9. Februar 1961.

[1] IV. Mitt. vgl. U. Renner und D. A. Prins, Exper. *17*, 106 (1961).
[2] U. Renner, Exper. *15*, 185 (1959).
[3] A. N. Ratnagiriswaran und K. Venkatochalom, Quart. J. Pharm. Pharmacol. *12*, 174 (1939).
[4] M. Gorman, N. Neuss, N. J. Cone und J. A. Deyrup, J. Amer. chem. Soc. *82*, 1142 (1960).
[5] K. V. Rao, J. org. Chem. *23*, 1455 (1958).
[6] N. Neuss und N. J. Cone, Exper. *15*, 414 (1959).
[7] Die angegebenen Formeln sind analytisch gesichert. Die Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert.
[8] Die Identität unseres Dregamins mit dem von Neuss et al.[6] beschriebenen Alkaloid wurde durch Vergleich der IR-Spektren der freien Basen und der Röntgen-Pulverdiagramme der Basen sowie ihrer Hydrochloride bestätigt. Herrn Dr. Neuss sei auch an dieser Stelle für die freundliche Durchführung der Vergleichsbestimmungen bestens gedankt.
[9] Vgl. N. Neuss, *Physical Data of Indole and Dihydroindole Alkaloids*, 4th ed. (Eli Lilly & Co., Indianapolis, Ind., 1960), Nr. 26 und 73.
[10] S. A. Warsi und Bashin Ahmed, Pakistan J. Sci. *1*, 128 (1949).
[11] Den HH. Dres. E. Girod und H. Wagner und ihren Mitarbeitern danken wir für Spektren und Mikroanalysen.

Free Amino Acid Patterns and other Chemical Constituents of Rabbits' Blood and Blood Vessels[1]

To date, the chemical structure of normal and diseased blood vessels of animals and man has been studied but incompletely. Some data on lipids, especially on cholesterol, and sporadic data on mucopolysaccharides, are available. The study of amino acids has been greatly neglected.

A study of blood vessels of normo- and of hypercholesteremic New Zealand white rabbits was undertaken. The question posed was the possible relationship between blood serum and various intact and altered sectors of blood vessels with regard to amino acid patterns and other chemical substances.

Tissue extract from ascending aorta and arch, thoracic aorta, abdominal aorta and the *vena cava* were prepared. Of the 25 principal amino acids 21 were found in extracts of rabbits' blood vessels but only 16 in blood serum of the same animals by circular paper chromatography. This method, although not suitable for quantitative assays, proved useful for purposes of orientation.

The pattern of free *amino acids* for the same vascular sector differed from one rabbit to another. Distribution of amino acids in the three aortic sectors from one and the same rabbit was not the same. It was impossible to correlate the amino acid spectra of different animals nor for a single animal, regardless whether one attempted to group the amino acids by their chemical characteristics or tried to follow the distribution of essential amino acids. The only amino acid derivative detected occasionally in one or another vascular segment was α-aminobutyric acid.

In rabbits with plaques in the ascending aorta the frequency of amino acids was less than in the intact descending aorta. In animals whose thoracic aorta was diseased in addition to the ascending part, the frequency of amino acids was lowered in both affected sectors. The shift paralleled the degree of disease. As the frequency of free amino acids decreased in the altered sectors it increased in the intact abdominal aorta.

Of interest was the shift of methionine in the aorta from disease of proximal sectors to intact distal parts. Glutamic acid and leucine increased parallel to tissue damage. Alanine and isoleucine were often present in diseased aorta but less frequent in normal sectors (Table I).

Total *protein* of the *vena cava* and the abdominal aorta of normal rabbits was about 30% lower than that of the other aortic sectors. The thoracic aorta had, as a rule, the highest protein content. The total protein in the ascending and thoracic sectors of hypercholesteremic rabbits was 30% higher than in the abdominal aorta and 54% higher than in the *vena cava*. The ascending and abdominal aorta had in these animals, on the average, a 25% higher *lipid* content than the thoracic aorta or the *vena cava*. Thoracic aorta *cholesterol* of normal rabbits was usually 9% lower than that of other aortic segments or *vena cava*. Cholesterol in the ascending aorta of hypercholesteremic rabbits was $2^1/_2$ times higher than in the thoracic aorta and 4 times the amount detected in the abdominal sectors (Table II).

All rabbits of the experimental series had elevated blood lipid, cholesterol and protein. All these substances were also increased in the aortic extract. However, some rabbits with extreme hyperlipemia-hypercholesteremia had less lipid and (or) cholesterol in their aorta than other rabbits with a lesser degree of blood lipid and cholesterol elevation. These substances were lowest in the abdominal aorta of animals in whom plaques were present in the

[1] Supported by grant H-2534 (C-3) from the National Heart Institute, N.I.H., and by a grant from the Eli Lilly Co.

Tab. I. Frequency of free amino acids in blood vessels and in serum of normo- and of hypercholesteremic rabbits

No.	Free aminoacids	Ascending	Thoracic	Abdominal	All Aorta	*Vena cava*	Blood serum	Ascending	Thoracic	Abdominal	All Aorta	*Vena cava*	Blood serum
1	Alanine	9.0	25.0	16.0	17.0	25.0	50.0	30	20	20	23.0	10	10
2	Arginine	18.2	0.0	25.0	14.3	37.4	50.0	30	40	40	36.7	0	60
3	Aspartic acid	0.0	0.0	16.6	5.7	12.5	10.0	30	30	20	26.8	0	10
4	Cysteine	36.4	25.0	33.3	31.4	62.5	50.0	30	40	60	43.0	30	50
5	Cystine	82.0	100.0	100.0	94.0	100.0	100.0	80	80	80	80.0	70	100
6	Ethionine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0	0	9.0	0	0
7	Glutamic acid	18.2	25.0	33.3	25.6	12.5	20.0	70	70	70	70.0	80	90
8	Glutathione, red.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0	0
9	Glycine	45.5	16.6	42.0	34.4	12.5	20.0	50	30	50	43.0	80	80
10	Histidine	9.0	25.0	8.4	14.3	12.5	30.0	60	30	50	47.0	40	20
11	Homocysteine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0	0
12	Hydroxyproline	0.0	0.0	8.4	2.9	0.0	10.0	0	0	0	0.0	0	0
13	Isoleucine	18.2	16.6	25.0	20.0	37.4	0.0	50	50	50	50.0	20	10
14	Leucine	27.2	33.3	16.6	25.8	50.0	10.0	70	60	40	56.5	50	10
15	Lysine	36.4	33.3	42.0	37.2	50.0	50.0	50	50	40	47.0	40	20
16	Methionine	36.4	58.0	25.0	40.0	75.0	20.0	20	30	50	33.0	60	20
17	Norleucine	36.4	16.6	33.3	28.6	37.4	0.0	70	80	60	70.0	40	0
18	Phenylalanine	36.4	25.0	25.0	28.6	50.0	0.0	50	40	30	40.0	40	20
19	Proline	18.2	25.0	42.0	28.6	50.0	20.0	20	40	50	36.6	60	50
20	Serine	0.0	16.6	0.0	5.7	12.5	30.0	10	30	20	20.0	20	0
21	Thiolhistidine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0	0
22	Threonine	36.4	33.3	42.0	37.2	37.4	50.0	60	90	90	80.0	50	80
23	Tryptophane	18.2	0.0	16.6	11.4	0.0	0.0	0	10	10	6.6	0	0
24	Tyrosine	45.5	16.6	25.0	28.6	25.0	0.0	20	70	60	50.0	40	40
25	Valine	9.0	8.4	33.3	17.1	0.0	10.0	40	0	30	23.0	0	0
	α-Aminobutyric acid	9.0	0.0	16.6	8.6	25.0	0.0	10	10	0	6.6	0	0

Amino acids listed alphabetically; frequency expressed in %; first six columns refer to normal rabbits, second set of six columns refer to experimental animals.

Tab. 2. Amounts of total protein, lipid and cholesterol and number of free amino acids in blood vessels and in serum of normo- and of hypercholesteremic rabbits

Per 100 ml of tissue extract or blood serum		Ascending			Thoracic			Abdominal			All Aorta			*Vena cava*			Blood serum		
		min.	avg.	max.	min.	avg.	max.	min.	avg.	max.	min.	avg.	max.	min.	avg.	max.	min.	avg.	max.
total protein	(g)	1.11	2.09	3.40	1.84	2.83	3.80	1.35	1.92	2.94	1.84	2.28	3.23	0.63	1.51	2.20	4.25	5.75	7.85
total lipid	(mg)	110	212	555	29	145	485	70	178	545	88	178	528	60	148	470	215	566	1000
total cholesterol	(mg)	1.70	3.30	5.90	1.00	3.05	6.60	1.10	3.40	11.0	1.63	3.25	6.60	1.00	3.29	5.30	33.0	62.3	84.0
No. of free aminoacids		4	5.45	7	3	5.00	8	3	6.35	8	4	5.60	8	5	6.44	8	4	5.30	6
Per 100 ml of tissue extract or blood serum		Ascending			Thoracic			Abdominal			All Aorta			*Vena cava*			Blood serum		
		min.	avg.	max.	min.	avg.	max.	min.	avg.	max.	min.	avg.	max.	min.	avg.	max.	min.	avg.	max.
total protein	(g)	2.96	5.60	8.70	3.11	5.12	7.90	2.20	3.70	5.55	2.91	4.86	6.80	1.06	2.34	5.65	7.55	8.89	10.4
total lipid	(mg)	242	621	985	305	457	690	222	492	800	274	523	778	90	154	200	1710	2199	3490
total cholesterol	(mg)	12.0	32.0	50.0	6.30	13.1	22.0	2.90	8.07	19.7	7.90	17.5	30.6	4.90	9.65	15.0	440	2869	5800
No. of free aminoacids		7	8.5	10	7	9	10	7	9.2	10	7	8.7	10	6	7.3	8	6	6.7	8

Minimum, average and maximum amounts of total protein (expressed in g/100 ml of tissue extract or serum), of total lipid (as mg/100 ml) and of total cholesterol (as mg/100 ml); minimum, average and maximum number of free amino acids detected in this material.

thoracic segment as well as in the ascending aorta. The reverse was found for protein and for the frequency of free amino acids. The amount of lipid and cholesterol could not be correlated with the type of amino acids recovered from blood vessels whether one compared the same sector from different rabbits or various sectors from the same animal.

The inverted relation between total protein and the number of free amino acids in normal vascular tissue should be noted and also a similar relationship between total protein and total lipid-cholesterol. Segmental differences could signify local differences in protein hydrolysis or in protein synthesis.

The lack of direct proportion between lipid and cholesterol of the diseased aorta and the degree of hyperlipemia and hypercholesteremia had not been anticipated since the chain of 'cholesterol diet—hypercholesteremia—cholesterol atherosclerosis' has been well established for the rabbit. The validity of the filtration theory for human atherosclerosis may be debatable although it has found widespread acceptance. We are reminded of anatomic structural differences of various parts of the aorta. With regional variations in the amount of endothelial, muscular, connective tissue and other elements one may expect differences in chemical composition as well.

The fact that chemical changes were present in grossly intact aortic sectors of hypercholesteremic rabbits indicates that chemical changes precede anatomical alterations.

Zusammenfassung. Die Verteilung der freien Aminosäuren, von Protein, Fett und Cholesterin im Blut und in verschiedenen Gefässen normaler und hypercholesteremischer Kaninchen wurde untersucht. Geschädigte Aortaabschnitte erhielten mehr Protein, Fett und Cholesterin, aber weniger freie Aminosäuren als normale.

A. F. Engel and O. J. Pollak

Dover Medical Research Center, Dover (Delaware), January 19, 1961.

Release of Histamine by Cotton Dust Extracts from Human Lung Tissue *in vitro*

In previous communications[1,2] the hypothesis has been advanced that at least some of the symptoms of byssinosis (cotton worker's pneumoconiosis) are caused by a histamine-releasing substance present in the dust inhaled by cardroom workers in the cotton industry.

This hypothesis was based on the results of dust inhalation experiments in man and on some evidence derived from application of cotton dust extracts in animal preparations. Further evidence from animal experiments supporting such a theory has been published by Antweiler[3,4].

It is well known, however, that histamine release varies with the tissue and animal species under study, and these differences in actions of histamine-releasing substances are only partly explained by tissue and species differences in histamine content[5].

Our own previous experiments, as well as those made by Antweiler, provided only indirect evidence in favour of histamine release as a causal factor in byssinosis. It remained to be demonstrated that cotton dust contains a substance capable of releasing histamine in human lung tissue. This communication presents evidence that this is indeed the case.

An extract of cotton dust was prepared as previously described[2], except for the use of Tyrode solution instead

Tab. I. Histamine release from human lung tissue *in vitro*

Sample No.	1	2	3	4	5	6
Amount of lung tissue (g)	1.2	1.2	—	—	1.2	1.2
Tyrode solution (ml)	2	2	4	4	3	3
Cotton dust extract (ml)	1	1	1	1	—	—
Histamine in filtrate (μg)	1.4	1.4	0.1	0.1	0.6	0.7

[1] A. Bouhuys, S.-E. Lindell, and G. Lundin, Medical Research Councils Panel on Byssinosis, June 4th (1959).

[2] A. Bouhuys, S.-E. Lindell, and G. Lundin, Brit. Med. J. *i*, 324 (1960).

[3] H. Antweiler, Naturwiss. *46*, 493 (1959).

[4] H. Antweiler, Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. *17*, 574 (1960).

[5] W. D. M. Paton, Pharmacol. Rev. *9*, 269 (1957).

Tab. II. Histamine release from human lung tissue *in vitro*

Sample No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Amount of lung tissue	(g)	2	2	—	—	2	2	2	2	2	2	2	2
Tyrode solution	(ml)	2	2	4	5	3	3	2	2	2	2	3	3
Cotton dust extract	(ml)	1	1	1	1	—	—	—	—	1	1	—	—
								48/80		Histamine			
								1 mg in 1 ml		10 μg in 1 ml			
Histamine in filtrate	(μg)	2.2	1.8	0.1	0.1	0.9	0.9	1.8	2.0	7.5	6.3	16.0	20.0

of saline. The sample of cotton dust was collected in a ventilator in a card-room in the same way as the dust previously used.

Specimens of macroscopically normal human lung tissue were obtained from patients operated upon for bronchial carcinoma (Table I) or pulmonary tuberculosis (Table II). The lung tissue was minced with scissors and washed once with Tyrode solution.

Aliquots of lung tissue weighing 1.2 or 2 g were suspended in 2 ml of Tyrode solution containing 1 mg of glucose per ml[6] and 1 ml of cotton dust extract added (Tables I and II, samples 1 and 2).

The incubation, which was done in a shaking incubator at 37°C, lasted for 20 min.

The suspension fluid was separated from the lung tissue particles by filtration through sintered porcelain filters. The filtrate was heated to boiling and diluted to 5 ml with Tyrode solution.

The following controls were employed: (a) The spontaneous histamine release in lung tissue during the incubation was measured (Tables I and II, samples 5 and 6). (b) The amount of histamine derived from the cotton dust extract itself was measured (Tables I and II, samples 3 and 4). (c) For comparison the histamine release caused by compound 48/80, a well known histamine-releasing drug, was studied (Table II, samples 7 and 8). (d) To get some information on the possible inactivation of some of the released histamine during the incubation, 10 μg of histamine base was added to the complete incubation mixture (Table II, samples 9 and 10). (e) To estimate the total histamine content in the aliquots of lung tissue, 2 g of tissue in 3 ml Tyrode solution were boiled immediately[7] and then filtered (Table II, samples 11 and 12).

The amount of histamine in the filtrates was measured by bioassay on the isolated guinea-pig ileum. The specificity of the gut-contracting activity was tested with an anti-histamine drug (mepyramine) in a concentration just sufficient to inhibit completely equiactive doses of histamine. The person who performed the bio-assay had no knowledge of the incubation schemes.

The results are shown in Tables I and II. In both series of experiments, the amount of histamine released in the samples containing cotton dust extract was about twice as much as the amount spontaneously released from lung tissue. The cotton dust extract itself released negligible amounts of histamine. This is in agreement with earlier observations[2].

Compound 48/80 caused release of histamine quantitatively comparable to that induced by cotton dust extract. The amount of histamine released both by cotton dust extract and by 48/80 corresponded to about 5% of the total histamine content of the lung tissue. This may be compared with the results of MONGAR and SCHILD[8], who found that 48/80 released about 13% of the histamine in guinea-pig lung.

LILJA et al.[9] have found that human lung tissue can inactivate histamine by methylation *in vitro*. It was therefore considered desirable to measure the inactivation of histamine under the present conditions (Table II, samples 9 and 10). Histamine release by cotton dust extract accounts for about 2 mg of histamine in the filtrate of these samples (cf. samples 1 and 2); it is therefore estimated that about 50% of added histamine was inactivated during the 20 min incubation. Therefore, the measured amounts of histamine released from the lung tissue in our experiments appear to be underestimates of the true values.

The results of the present investigation are considered to provide additional evidence in favour of the hypothesis that some of the symptoms of byssinosis in card-room workers are caused by the presence of a histamine-liberating substance in cotton dust. This mechanism of histamine-release does not require previous sensitization as do the mechanisms previously proposed by PRAUSNITZ[10] and by HAWORTH and MCDONALD[11].

Zusammenfassung. Baumwollextrakt, bei 37° mit zerkleinertem menschlichem Lungengewebe inkubiert, setzt daraus Histamin in ähnlichen Mengen wie Compound 48/80 frei.

Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die Symptome der Byssinosis bei Baumwollspinnerei-Arbeitern mindestens teilweise durch eine Histamin-freisetzende Substanz im Baumwollstaub verursacht werden.

A. BOUHUYS and S.-E. LINDELL[12]

Laboratory of Clinical Physiology, University Hospital, Leiden (The Netherlands), and Laboratory of Clinical Physiology, Sahlgrenska Sjukhuset, Göteborg (Sweden), January 26, 1961.

[6] B. DIAMANT, X. Scandinavian Physiol. Congr. in Oslo (1960), p. 34.
[7] J. L. MONGAR and H. O. SCHILD, Brit. J. Pharmacol. *8*, 103 (1953).
[8] J. L. MONGAR and H. O. SCHILD, J. Physiol. *118*, 461 (1952).
[9] B. LILJA, S.-E. LINDELL, and T. SALDÉEN, J. Allergy *31*, 492 (1960).
[10] C. PRAUSNITZ, Medical Research Council Report: *Investigations on Respiratory Dust Diseases in Operatives in the Cotton Industry*. H. M. Stationery Office (1936).
[11] E. HAWORTH and A. D. MCDONALD, J. Hyg. *37*, 234 (1937).
[12] The authors thank Professor A. G. BROM (Leiden) and Docent N. P. BERG (Gothenburg) for their help in making surgical specimens of lung tissue available, Dr. L. MULLER (Enschede) for supplying samples of cotton dust, and Miss M.-B. JOHANSSON for valuable technical assistance.
This work was supported in part by research grants to one of us (A.B.) from the 'Organisation for Health Research T.N.O.' (The Hague) and the 'Foundation for the Advancement of Medical Scientific Research' (Arnhem).

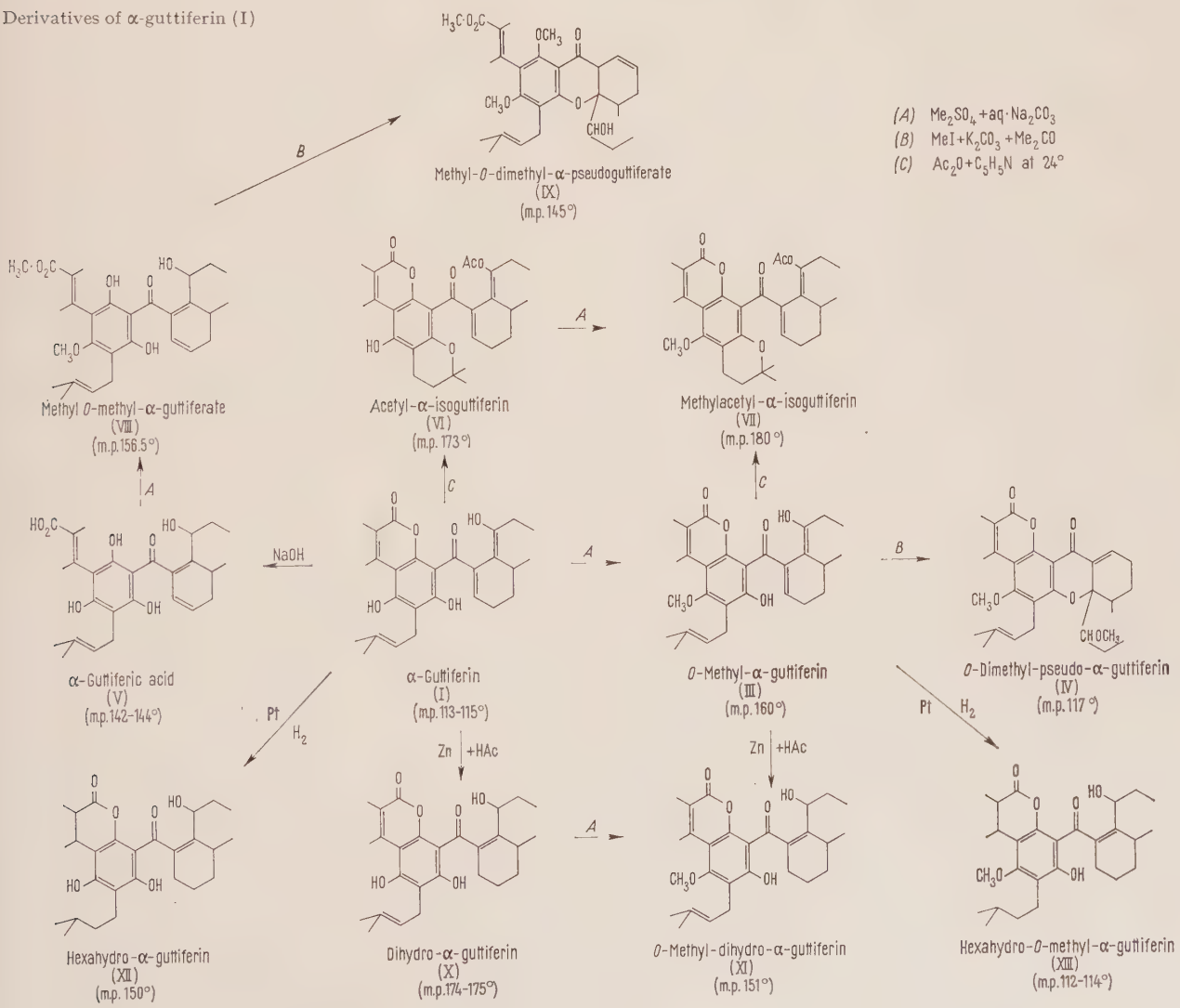
α- and β-Guttiferins

The distribution of kindred antistaphylococcal principles in every tissue, particularly in the seed coat and gamboge, the resinous exudation, of *Garcinia morella* Desr. was inferred from chromatographic, optical and spectral evidence[1–4]. Next to morellin[5], 'guttiferin' soluble in aq. sodium carbonate forms the major component fraction[6] of extracts of the seed coat from which α-*guttiferin*(I), $C_{33}H_{38}O_8$, m.p. 113–115° $[(\alpha)_D^{26} = -475°$ (c, 1.5 in $CHCl_3$); λ_{max}^{EtOH} 278 mμ ($\log K = 1.57$) and 360 mμ ($\log K = 1.327$)] has been separated from γ,δ and possibly other guttiferins[7], as a sparingly soluble orange yellow crystalline *pyridine-complex* $C_{33}H_{38}O_8 \cdot C_5H_5N$, m.p. 115–117° $[(\alpha)_D^{26} = -561.2°$ (c, 1.496 in $CHCl_3$); λ_{max}^{EtOH} 278 mμ ($\log K = 1.5763$) and 360 mμ ($\log K = 1.3385$)].

Likewise, the allied pigment *β-guttiferin* (II) $C_{29}H_{36}O_6$ or $C_{33-34}H_{38-40}O_7$, m.p. 86–91° $[(\alpha)_D^{24} = -698.2°$ (c, 1.063 in $CHCl_3$); λ_{max}^{EtOH} 291 mμ ($\log K = 1.62$) and 362 mμ ($\log K = 1.53$); (II) may be identical with α-gambogic acid[8]] is the main constituent crystallizing as a *complex* with one molecule of pyridine melting at 148–149° $[(\alpha)_D^{24} = -624.3°$ (c, 1.276 in $CHCl_3$); λ_{max}^{EtOH} 290 mμ ($\log K = 1.7803$) and 362 mμ ($\log K = 1.7076$)] from ether soluble Indian, Malayan and Indonesian gamboge. A prerequisite for formation of these complexes is the presence of the acidic phenol and enol groups (*vide infra*). The

[1] P. L. Narasimha Rao, T. R. Gupta, and D. Rajagopal Rao, unpublished results.
[2] T. R. Gupta, A. I. I. Sci. Thesis (1952), Indian Institute of Science, Bangalore.
[3] D. Rajagopal Rao, A. I. I. Sci. Thesis (1955), Indian Institute of Science, Bangalore.
[4] D. V. Krishna Murthy and P. L. Narasimha Rao, J. sci. industr. Res. (India) *12 B*, 565 (1953).
[5] P. L. Narasimha Rao and S. C. L. Verma, J. sci. industr. Res. *10 B*, 184 (1951); *11 B*, 206 (1952).
[6] D. Rajagopal Rao, K. V. Nageswara Rao, and P. L. Narasimha Rao, *Symposium on Antibiotics* (Published by the Council of Scientific and Industrial Research, India 1956), p. 46.
[7] V. S. Gupta and P. L. Narasimha Rao, unpublished results.
[8] M. Amorosa, Ann. chim. *45*, 40 (1955). – M. Amorosa and L. Lipparini, Ann. chim. *45*, 977 (1955). – The nomenclature of several constituent fractions of gamboge (none of them obtained in a pure condition till recently) described by various workers since Newmann (Chym. Med. 1751) has been far from satisfactory and it thus seems preferable to designate this compound as β-guttiferin in line with the other constituents of the tree even though it may prove identical with α-gambogic acid.

Derivatives of α-guttiferin (I)



kinship of (I) and (II) to morellin[9] $C_{33}H_{38}O_7$ and moreollin[10] $C_{33}H_{40}O_8$, two known pigments from the seed coat is apparent from the chemical and biological properties[2,3,6].

The characteristic formation of analogous derivatives from (I) and (II) is, however, marked by the facile crystallisation of those of (I) presented in the Figure. (I) and (II) contain no methoxyl or free carboxylic groups. Three of the oxygen atoms in (I) are demonstrable as acidic phenol (solubility in aq. sodium carbonate), enol (formation of red copper complex analogous to isomorellin[10]) and a tertiary hydroxyl group. Two more, phenolic and carboxyl carbonyl, contribute to an α,β-unsaturated δ-lactone system. A hindered phenol, a carbonyl group para to the acidic phenolic moiety and a possible oxide ring make up for the remaining three. The presence of three double bonds is indicated by catalytic reduction of (I) and (III) to the corresponding *hexahydro-compounds* (XII) and (XIII). (I) reacts with carbonyl reagents, but the products do not seem typical. With semicarbazide and hydroxylamine, (I) forms $C_{34}H_{41}O_8N_3$, m.p. 255° (sinters at 180°), and $C_{33}H_{40}O_8N_2$, m.p. 172–174°, respectively. Similarly the *methyl ether* (III) reacts with semicarbazide and phenylhydrazine to give $C_{35}H_{43}O_8N_3$, m.p. 128–132°, and $C_{40}H_{46}O_7N_2$, m.p. 153–155°, respectively. The three phenolic groups referred to are, apparently, part of phloroglucinol recognized among the products of alkali fusion of (I) and (II) containing methylheptenol, homophthalic and isovaleric acids which are also formed by morellin[11,12]. (I) does not react with diazoaminobenzene nor couple with diazotized sulphanilic acid, thus indicating the presence of a fully substituted phloroglucinol structure as represented in the Figure. By the action of alkalies, the lactone rings in (I) and (II) are opened and the liberated acids changed to the *trans* form, *guttiferic acids* (cf. V), accompanied by a shift in the double bonds affecting the enolic group. Physico-chemical data which include ultra-violet and infrared spectra and colour reactions support the isomeric changes (vide Fig.) occurring during methylation of (I) and (III) to the *dimethyl ether* (*IV*) and of (VIII) to (IX) by method (B) *viz.*, with methyl iodide in acetone in presence of potassium carbonate, as well as during acetylation to the *monoacetyl-compound* (VI) with pyridine and acetic anhydride (method C).

Apart from formation of analogous derivatives with similar spectral characteristics, the close relationship between (I) and (II) is further suggested by oxidation with sodium hypobromite to the same *bromo-acid* m.p. 199 to 200° [λ_{max}^{EtOH} 230 mμ ($\log K = 1.625$) and 312 mμ ($\log K = 1.56$] still under investigation. These and other degradative reactions of (I) and (II) will be discussed elsewhere.

Like morellin[9,12,13], (I) and (II) are specifically active against Gram-positive bacteria and the bacteriostatic effect against *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (MIC 0.1–1 μg/ml) is reversed by methionine, albeit to a lesser extent. Further, they show similar cross reactions. The presence of blood serum on their antibacterial activity is less pronounced and experimental staphylococcal infections in mice are controlled by (I) and (II).

Zusammenfassung. Die Isolierung, Charakterisierung und antibiotischen Eigenschaften von α-Guttiferin (I), $C_{33}H_{38}O_8$ (Smp. 113–115°), aus den Samenhülsen und vom nahe verwandten β-Guttiferin (II), $C_{29}H_{36}O_6$ oder $C_{33-34}H_{38-40}O_8$ (Smp. 86–91°) (möglicherweise identisch mit α-Gambogasäure), aus Gummigutt, dem harzigen Sekret von *Garcinia morella*, wurden beschrieben und ihre Verwandtschaft zu Morellin und Moreollin, den beiden bekannten Pigmenten der Samenhülsen, dargelegt. Für I wurde eine Partialstruktur vorgeschlagen. Die Bildung derselben komplexen bromhaltigen Säure vom Smp. 199 bis 200° unter der Einwirkung von Natriumhypobromit auf I und II spricht ferner für deren nahe strukturelle Verwandtschaft.

K. V. NAGESWARA RAO and P. L. NARASIMHA RAO

Antibiotics Laboratory, Department of Biochemistry, Indian Institute of Science, Bangalore (India), December 23, 1960.

[9] P. L. NARASIMHA RAO, D. V. KRISHNA MURTHY, and S. C. L. VERMA, Naturwiss. *41*, 66 (1954). – The previous molecular formula for morellin $C_{30}H_{34}O_6$ has been subsequently revised to $C_{33}H_{38}O_7$ (*vide* [12]).

[10] The revised molecular formula $C_{33}H_{40}O_8$ (cf. [4]) conforms to its formation from morellin by the action of alcoholic potassium acetate and its change to isomorellin by pyridine (P. L. NARASIMHA RAO et al., unpublished results).

[11] B. S. RAO, J. chem. Soc. *1937*, 853.

[12] S. C. L. VERMA, Ph. D. Thesis (Sept. 1954), University of Bombay.

[13] D. V. KRISHNA MURTHY and P. L. NARASIMHA RAO, *Symposium on Antibiotics* (published by the Council of Scientific and Industrial Research, India 1956, p. 180.

Estrogenic Activity and Steric Hindrance to Coplanarity of Alkyl Substituted 4,4′-Dimethoxystilbenes[1]

Since the pioneering work on artificial estrogens by COOK and DODDS[2], a great number of compounds have been tested for estrogenic properties[3]. Comparison of activity is difficult because of the various assay procedures that have been used. Compounds showing activity comparable to the natural female sex hormones are to be found in the classes of stilbene derivatives (stilbestrol), the diphenylethane derivatives (dienestrol and hexestrol) and among the doisynolic acids. The most active substances have in common that the molecules consist of a rather large, rigid, skeleton with, in most cases, a hydroxyl group at both ends. Possibly, there exists an optimum distance for the two hydroxyl groups[4]. From the large differences in biological activity among the α,α′-dialkyl-4,4′-dihydroxystilbenes, it is clear that also other structural features are important. OKI studied stilbene derivatives with halogeno and thiomethyl groups and concluded, from spectroscopical data, that the thickness of the molecule may be a critical factor[5]. We have measured the estrogenic properties of a series of alkyl substituted 4,4′-dimethoxystilbenes[6], in which other than steric effects are minimized.

[1] The contents of this paper have been reported in more detail in the thesis of W. H. LAARHOVEN, Leiden (1959).

[2] J. W. COOK and E. C. DODDS, Nature *131*, 56, 205 (1933). – E. C. DODDS and W. LAWSON, Nature *137*, 996 (1936); *139*, 627, 1068 (1937); *140*, 772 (1937).

[3] See for reviews: U. V. SOLMSEN, Chem. Reviews *37*, 400 (1945). – J. GRUNDY, Chem. Reviews *57*, 281 (1957).

[4] F. W. SCHUELER, Science *103*, 221 (1946). – H. H. KEASLING and F. W. SCHUELER, J. Amer. pharm. Assoc. *39*, 87 (1950).

[5] M. OKI, Bull. chem. Soc. Japan *25*, 112 (1952); *26*, 37 (1953).

[6] W. H. LAARHOVEN, R. J. F. NIVARD, and E. HAVINGA, Rec. Trav. chim. Pays-Bas *79*, 1153 (1960); *80*, in press (1961).

Relation between relative estrogenic activity and angle of twist in substituted 4,4′-dimethoxystilbenes

Substitution on the 4,4′-dimethoxystilbene	estrogenic activity[a]	angle φ[b]	relative activity[c]
none	10	0°	< 0.06 %
α-methyl	0.47	26°	~1 %
2,2′-dimethyl	5.5	28°	~0.1 %
2,2′-diethyl	5.4	30°	~0.1 %
α,2′-dimethyl	0.47	31°	~1 %
α,2-dimethyl	0.52	33°	~1 %
2,2′,6,6′-tetramethyl	0.21	45°	~3 %
α,α′-dimethyl	0.12	53°	~5 %
α,2,2′-trimethyl	0.11	60°	~5 %
α,α′-diethyl	0.006	68°	100 %
α,α′,2-trimethyl	0.0058	71°	100 %
α,α′,2,2′-tetramethyl	0.0051	90°	⩾ 100 %

[a] Minimum dosis, mg. Using groups of five mice for each assay, compounds dissolved in peanut oil were injected subcutaneously. For each compound the concentration was determined that brought about cornification in vaginal smears of some – not all – mice of the test group. For exact establishment of minimum doses, more animals would be required, but we think that for the present preliminary account our method is adequate. It was verified that with 0.1 γ estradiol cornification could still be induced.

[b] Calculated from UV-data[6].

[c] Dimethylether of stilbestrol as a standard (= 100).

Biological assay was made with the Allen-Doisy test. In view of the close structural similarity of the compounds tested, we suppose that the disadvantage of the method does not influence our results. Because of difficulty in purifying the hydroxy compounds, we tested the dimethoxy compounds. As only relative potencies are compared, this method seems to be permissible.

Our results are summarized in the Table, which shows that the activity increases with the number and size of the alkyl substituents. The effect is greater with the alkyl groups in the α- than in the *o*-positions. Parallelism is obvious between the relative estrogenic activities and the angle of twist of the phenyl nuclei. It suggests that in the class of dimethoxystilbenes steric hindrance to coplanarity may be one of the factors essential to strong biological activity. The strong increase of activity for angles between 60 and 70° is remarkable. The presence of substituents of a certain form and bulkiness may also be one of the requirements for high activity. The data on the two last compounds prove that optimal activity may be obtained without ethyl groups as α-substituents.

Zusammenfassung. Für eine Reihe Methyl- bzw. Äthyl-substituierter 4,4′-Dimethoxystilbene ist die relative östrogene Wirksamkeit ermittelt worden. Dabei ergab sich eine Parallele zwischen der Aktivität und dem Grad der sterischen Hinderung, welche die Koplanarität der beiden Phenylkerne aufhebt. Maximale Wirksamkeit konnte auch mit Methyl-, nicht nur mit Äthylgruppen an der Doppelbindung erreicht werden.

W. H. Laarhoven, R. J. F. Nivard, and E. Havinga

Laboratory of Organic Chemistry, Preclinical Institute, R.C. University, Nijmegen, and Laboratory of Organic Chemistry, The University, Leiden (The Netherlands), January 24, 1961.

Some Physico-Chemical Properties of Mouse Red Cells and Hemoglobin

Heterogeneities among adult hemoglobins from different inbred strains of mice have been demonstrated electrophoretically. By means of filter paper electrophoresis, two classes, a single-spot (Hb^1) and a diffuse type (Hb^2) have been distinguished[1]; by starch gel and starch block electrophoreses of hemoglobin from five inbred strains of mice, four distinct patterns could be observed separable by the position and number of bands[2]. The latter findings would indicate that there are probably more than the two allelic hemoglobin types that were postulated previously[3]. Although each vertebrate species was thought to have hemoglobins characteristically associated with its fetal stage and postnatal life, hemoglobins of newborn and later-stage fetuses of mice (*viz.*, C57BL/6J) were recently discovered to be indistinguishable from that of the adult upon starch gel electrophoresis; also, no significant differences of late fetal and adult mouse hemoglobin (*viz.*, CBA strain) could be detected with respect to alkali denaturation (J. Barrowman, personal communication). This paper reports on further methods applied to 'fetal' and adult mouse hemoglobin and red blood cells in attempts to detect specific differences.

Mice from seven inbred strains (C57BL/Ks, C57BL/6J, C57BR/cd, C58/J, DBA/1, DBA/2, BALB/c, and C3H/HeJ) and three hybrids (CAF_1, BAF_1, and BDF_1) were used. Fetal blood was derived from embryos that were at least two weeks old. Preparation of smears without placental (maternal) blood contamination from younger fetuses was technically difficult. It has been reported that hemoglobin of adult human red cells, in contradistinction to fetal hemoglobin, was readily eluted in a fixed smear by an acid citrate buffer[4–6]. In preliminary experiments with mouse red cells it was found that a slight increase of extraction time from 1 (optimal for man) to $1^1/_2$ min at a buffer-pH of 3.5 gave the most uniform results. Two stains were employed, the ferric ferricyanide reduction for free sulphydril groups and the iodination-coupled tetrazonium stain for aromatic amino acids. Human red blood cells stained by these methods also were used for purposes of comparison. Although neither of the histochemical techniques is specific for hemoglobin, under the conditions of the procedure they are satisfactory in view of the large amount (90%) of hemoglobin compared to other proteins in red blood cells. By the ferric ferricyanide reduction stain, red cells of all strains of mice, both adult and fetal, give a homogeneous deep blue color of Prussian blue prior to extraction. All strains of the original Hb^1 (C57BL/6, C57BR/cd, and C58/J), and also BALB/c (Hb^2) following acid denaturation display only a faint pale blue color, or are entirely devoid of color. A/J, DBA/1, DBA/2, and C3H/HeJ (all Hb^2) are not, or only partially extracted. In each instance adult and fetal red blood cells show equal

[1] H. M. Ranney and S. Gluecksohn-Waelsch, Ann. human Genet. *9*, 260 (1955).

[2] T. Ross, G. Schapira, T. C. Dreyfus, T. De Grouchy, G. Mathe, and T. Bernard, Nature *182*, 947 (1958).

[3] E. S. Russell and P. S. Gerald, Science *128*, 1569 (1958).

[4] E. Kleihauer, B. Hildegard, and K. Betke, Klin. Wschr. *35*, 637 (1957).

[5] H. Wilson, H. Nakai, and B. H. Landing, Stain Technology *35*, 205 (1960).

[6] A. Zipursky, A. Hull, F. D. White, and L. G. Israels, Lancet *1*, 451 (1959).

Blood smear from a 15 day old BDF_1 fetus stained by the ferric ferricyanide reduction stain for free sulphydril groups following acid extraction. Negative (extracted) red blood cells are presumably of maternal origin (C57BL/6); the unextracted (dark) cells are 'fetal' red cells staining similarly as the red cells of the father (DBA/2). × 600

acid solubility or resistance for the respective strain. Whereas human and mouse red blood cells give approximately similar intense Prussian blue stains, considerable less positive reaction is obtained in mice (tan) than man (brown) by the iodination-coupled tetrazonium stain. There were no readily perceptible differences in staining intensity among different strains of mice, or adult compared to fetal red blood cells.

Hybrid fetuses resulting from crosses of mothers having acid-extractable hemoglobin (C57BL/6 and BALB/c) and fathers with acid-resistant hemoglobin (A/J and DBA/2) contain the two types of red blood cells (Fig.). Since adult hybrids (CAF_1, BDF_1, BAF_1) have circulating red cells of only one kind, identical to their fathers in that they are not or incompletely eluted by acid, transplacental passage of maternal blood may be inferred. The presence of two kinds of hemoglobin in e.g. BDF_1 fetuses (C57BL/6 females × DBA/2 males) has also been verified by agar gel electrophoresis, showing a single spot and diffuse pattern superimposed.

Circular paper chromatography was employed using Whatman filter paper No. 1; solvents applied were 10–50% aqueous pyridine and combinations of *N*-butanol, pyridine and water. The chromatographic data reveal that the hemoglobin variants lie within a narrow range of mobility; Rf values do not differ by more than ± 0.04 units independent of the eluent used, strain of mouse, and adult or fetal origin of the hemoglobin.

Zusammenfassung. Hämoglobin und Erythrozyten von prä- und postnatal untersuchten Inzuchtmäusen verhalten sich, was verschiedene physikalisch-chemische Analysen betrifft, ähnlich. Die Existenz eines fötalen Hämoglobins konnte nicht bewiesen werden.

H. MEIER[7]

Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory, Bar Harbor (Maine), November 22, 1961.

[7] This investigation was supported by a grant from the National Institutes of Health, P.H.S. C-4691.

Estimation of Decamethonium in Biological Fluids

In a previous work, it has been demonstrated that aqueous solutions of methonium salts, if mixed with a small amount of Nessler's reagent, develop a turbidity proportional to salts concentration. Through this very sensitive reaction, it has been possible to estimate very small amounts of methonium salts. Since this reaction is enhanced by the length of the carbon chain, it may be of a particular interest for detection of decamethonium[1] at low concentrations. On account of its strong curarizing action, C_{10} is widely employed in clinical and experimental pharmacology, and therefore its accurate estimation is very much needed in biological fluids, for which we previously postulated the use of the isotopic methods[2].

The direct application of the turbidimetric reaction to biological fluids, and specially to urine and serum, is impossible, owing to the presence of various interfering substances. It is necessary to discard these substances, without loss of C_{10}.

In this paper the results will be reported which relate to the application of this new reaction for quantitative estimation of C_{10} in biological fluids, such as blood serum and urine.

Urine procedure. To 10 ml of freshly collected normal human urine were added 100 mg of solid $HgCl_2$ and 1 ml of 2 *N* NaOH. The massive black precipitate was discarded by filtration, obtaining a slightly turbid filtrate. By addition of 2 ml of 10% HCl in glacial acetic acid, the solution becomes clear on mixing. Samples of 5 ml of the clear filtrate are collected and 0.2 ml of Nessler's reagent added. After 30 min, the turbidity was read in a Beckman spectrophotometer mod. D.U. at 580 mμ wavelength against a blank containing urine without C_{10}, similarly treated. In Figure 1, the data are given of the detection of different amounts of C_{10} added to urine.

As is shown, the urine method allows accurate determination of C_{10} concentrations between 20–200 γ/ml. It must be pointed that in the acid medium the reaction is

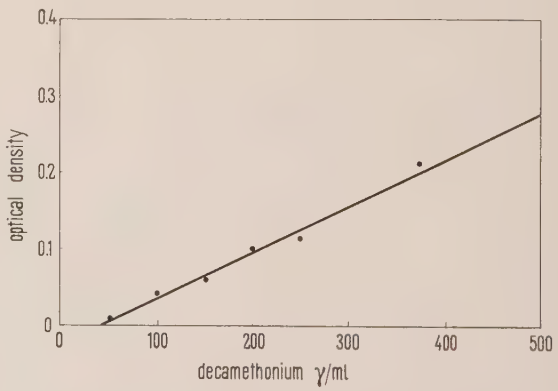


Fig. 1. Estimation by turbidity reaction of decamethonium in urine.

[1] further called C_{10}.

[2] C. MANNI, G. MORICCA, B. GIOVANELLA, and P. MAZZONI, Simposio Internazionale su Curaro, Curarosimili e Curarizzanti (I.T.E. 1958), p. 240.

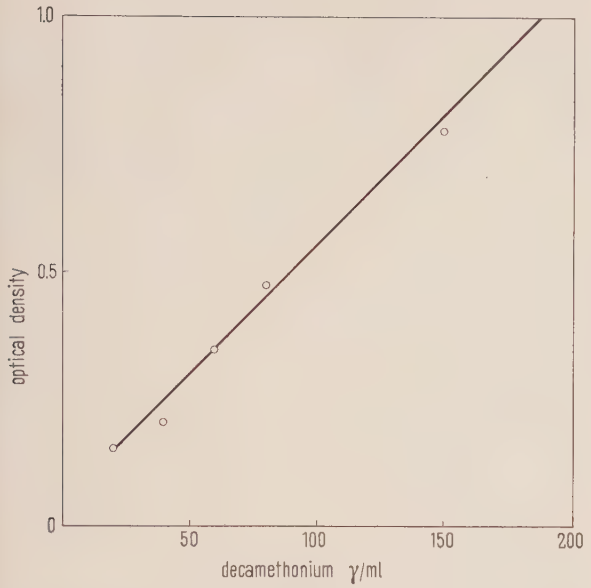


Fig. 2. Estimation by turbidity reaction of decamethonium in human blood serum.

not so specific as in alkaline. Two substances (promethazine (Fargan) and Lobeline), employed in clinical surgery, also give some turbidity.

Serum procedure. Since Nessler's reagent gives a partial protein precipitation, the main problem is represented by deproteinization without loss of C_{10} with a clear supernatant. The $HgCl_2$ treatment leaves the supernatant very turbid. The commonly used deproteinizing methods were employed unsuccessfully, and therefore the following technique was adopted: 5 ml of serum were dialized for 24 h with constant stirring, against 10 ml 0.5 *M* NaCl in order to improve the linearity of the reaction[3]. To a sample of 5 ml, 0.2 ml of Nessler's reagent were added and the turbidity was read as described for the urine, against a blank of serum without C_{10} dialysed against 0.5 *M* NaCl. As shown in Figure 2, there is a perfect linearity of the reaction; the sensitivity of the method falls between 100–500 γ/ml. The reaction occurs in alkaline medium and is absolutely specific.

Résumé. Les auteurs ont modifié la méthode de dosage de sels de méthonium, proposée dans leur travail précédent, pour rendre possible son application à la recherche du C_{10} dans les sérums et les urines.

Cette méthode est rigoureusement spécifique pour la détermination du décaméthonium dans le sérum entre 100 e 500 γ/ml mais moins spécifique pour les urines.

G. Moricca, B. Giovanella, C. Manni, and R. Cavaliere

Istituto Regina Elena for Cancer Research and Clinica Chirurgica della Università di Roma (Italy), December 23, 1960.

[3] B. Giovanella, C. Manni, and G. Moricca, Exper. *15*, 393 (1959).

N-Bromosuccinimide Action on Creatine Phosphokinase

Creatine phosphokinase was treated with *N*-bromosuccinimide (NBS) according to the method of Patchornik et al.[1]. Changes in the ultraviolet spectrum as well as appearance of new *N*-terminal residues were studied. Figure 1 gives the absorption spectra of the enzyme after addition of varying amounts of NBS in 8 *M* urea, – 0.1 *M* acetate–pH 4.0. (In each case readings were taken until they remained constant with time.) With approximately 10 *M* of NBS per mole of protein appreciable alterations in the spectrum begin to appear. Above an NBS concentration of 240 *M* no further changes occur. In Figure 2, where differences in the absorbancy at 280 mμ as a function of NBS concentration are plotted, the maximum amplitude of the drop in molar absorbancy for the phosphokinase is $38.2 \times 10^3/M$. If a decrease of $2.8 \times 10^3/M$ of free tryptophan is accepted[2], presence of 13–14 tryptophan residues is indicated. This value compares fairly with that of 11–12 residues obtained on chemical analysis[3].

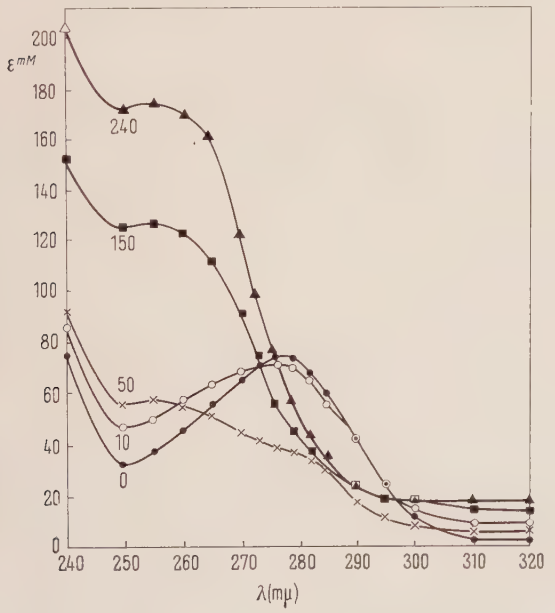


Fig. 1. Absorption spectra of creatine phosphokinase in 8 *M* urea – 0.1 *M* acetate pH 4.0 after treatment with different amounts of NBS. Numerals indicate moles of NBS/*M* of protein. Samples were read against a urea-bufferblank containing identical concentrations of NBS.

The phosphokinase used in these studies had been crystallized once according to the method of Kuby et al.[4] and appeared as one peak on examination in the ultracentrifuge. When it was not treated with NBS (control) but was dinitrophenylated (after exposure to urea-acetate buffer) for $2^1/_2$ h at room temperature in alcoholic solution made alkaline with $NaHCO_3$, dialysed against water, lyophilized, hydrolyzed for 16 h at 110°C with 6 *N* HCl and chromatographed[5], there appeared 5 spots identified as glutamic-aspartic, serine, threonine, glycine,

[1] A. Patchornik, W. B. Lawson, and B. Witkop, J. Amer. chem. Soc. *80*, 4748 (1958).
[2] T. Peters, Jr., C. R. trav. lab. Carlsberg *31*, 227 (1959).
[3] F. Friedberg, Arch. Biochem. Biophys. *61*, 263 (1956).
[4] S. A. Kuby, L. Noda, and H. A. Lardy, J. biol. Chem. *209*, 191 (1954).
[5] H. Fraenkel-Conrat, J. I. Harris, and A. L. Levy, in D. Glick, *Methods of Biochemical Analyses* (Interscience Publishers Inc., New York 1955), Vol. 2, p. 359.

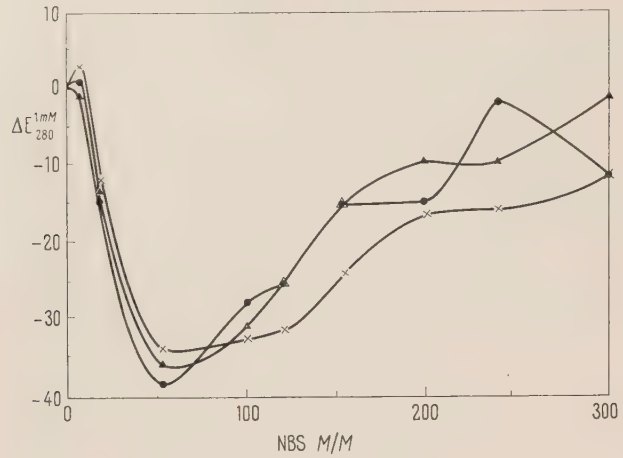


Fig. 2. Change in *mM* absorbancy of creatine phosphokinase treated with increasing amounts of NBS. After 15 min incubation (×). After 160 min incubation (●). After 290 min incubation (▲).

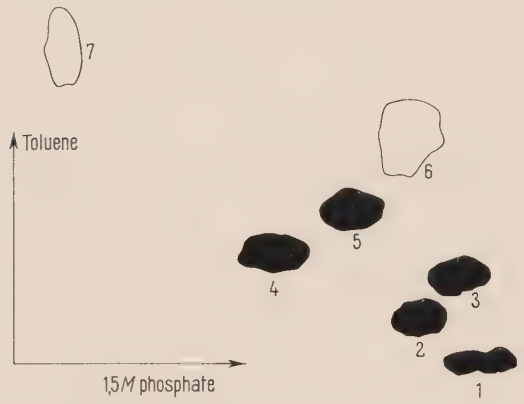


Fig. 3. Paper chromatography of DNP-amino acids from the hydrolysate of intact, dinitrophenylated creatine phosphokinase without NBS treatment (full spots). The additional compounds obtained after NBS reaction are indicated by hollow spots.

	M/*M* of protein		*M*/*M* of protein
(1) glutamic-aspartic	0.044	(5) alanine	0.024
(2) serine	0.022	(6) valine	0.152
(3) threonine	0.096	(7) unknown	0.078
(4) glycine	0.018		

Solvents: Toluene–pyridine chloroethane and 1.5 phosphate buffer (pH 6.0)[5]. The unknown spot was neither Di-DNP lysine nor Di-DNP tyrosine.

and alanine in quantities, however, so small as to make interpretation of the results difficult (Fig. 3). It might be that 1) protein impurities or absorbed amino acids in the preparation are responsible for these *N*-terminal traces; that 2) certain bonds are somewhat hydrolyzed during dinitrophenylation in alkaline medium or that 3) structure hindrances prevent proper activity by the fluoro-dinitrobenzene onto the end terminals. Two additional spots, valine and an unidentified substance are observed when the protein is exposed to 100 moles of NBS per mole of protein in the 0.1 *M* urea-acetate buffer, pH 4.0 for 1 h (followed by dialysis against 0.5% $NaHCO_3$) before dinitrophenylation, suggesting the existence of a try-val bond in the molecule. (Analysis of the aqueous layer remaining from the ether extraction yielded no additional *N*-residues.) Considered on the mole per mole basis, the quantity of the new *N*-terminal group formed by the action of the NBS is very small. Such bond cleavages, however, have been reported only in yields averaging 20–40% and sometimes even as low as 5–10% or less[6]. Why the number of new *N*-terminals formed does not correspond to the number of tryptophans in the molecule cannot be explained at present. A similar observation has been made with regard to lysozyme where seven residues had been expected[6]. It should also be mentioned that paper electrophoresis at pH 8.6 in barbiturate buffer before and after sulfite exposure[7] of the NBS treated protein did not reveal the presence of any split products.

Zusammenfassung. Behandlung von Kreatinphosphokinase mit überschüssigem *N*-Bromsuccinimid bewirkt eine Umwandlung der vorhandenen peptidartig gebundenen Tryptophanreste, welche sich durch die für diesen Vorgang charakteristische Veränderung des Spektrums anzeigt. Am unbehandelten Enzym liessen sich auch mit einem grossen Überschuss von NBS keine freien endständigen NH_2-Gruppen eindeutig nachweisen.

F. A. QUIOCHO, M. O'DELL, and F. FRIEDBERG[8]

Department of Biochemistry, Howard University Medical School, Washington (D.C.), December 30, 1960.

[6] L. K. RAMACHANDRAN and B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. *81*, 4028 (1959).
[7] L. WEIL and T. S. SEIBLES, Arch. Biochem. Biophys. *84*, 244 (1959).
[8] This work was aided by a grant from the Muscular Dystrophy Associations of America, Inc.

The Inhibitory Effect of Duodenal Souring on Shay Ulceration in Rat

SOKOLOV was the first to observe in 1904 that the gastric juice introduced into the dog duodenum intensively reduced the gastric secretion in the Pavlov pouch[1]. The presence of this duodenal inhibitory mechanism was consequently supported by several authors[2–6]. Various investigators produced from the duodenal mucosa the hormonal substances responsible for this effect[7,8]. Enterogastron decreases the gastric secretion also of cats, thus establishing the fact that the substance is not race-specific[9]. The degree of inhibition of experimental ulcers, a method renewed by SHAY[10], and originally described by TALMA[11], is extensively used in the evaluation of duodenal extracts, that is, enterogastron preparates[12]. We were interested in the question of whether duodenal

[1] A. SOKOLOV, quoted by B. P. Babkin, Medical Book Department of Harper and Brothers, New York (1950).
[2] J. J. DAY and D. R. WEBSTER, Amer. J. digest. Dis. *2*, 527 (1935).
[3] W. J. GRIFFITHS, J. Physiol. *87*, 34 (1936).
[4] I. J. PINCUS, J. E. THOMAS, and M. E. REHFUSS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *51*, 367 (1942).
[5] H. SHAY, J. GERSHON-COHEN, and S. S. FELS, Amer. J. digest. Dis. *9*, 124 (1942).
[6] E. L. BRACKNEY, A. P. THAL, and A. H. WANGENSTEEN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *88*, 302 (1955).
[7] J. S. GRAY, W. B. BRADLEY, and A. C. IVY, Amer. J. Physiol. *118*, 463 (1937).
[8] A. GREENGARD, A. P. HANDS, M. I. GROSSMAN, and A. C. IVY, Fed. Proc. *2*, 17 (1943).
[9] K. J. ÖNBRINK, Acta physiol. Scand. *21*, 120 (1950).
[10] H. SHAY, S. A. KOMAROV, S. S. FELS, D. MERANZE, M. GRUENSTEIN, and H. SIPLET, Gastroenterology *5*, 43 (1945).
[11] S. TALMA, Z. Klin. Med. *17*, 10 (1890).
[12] F. PAULS, A. N. WICK, and E. M. MACKAY, Gastroenterology *8*, 774 (1947).

souring, induced simultaneously with the SHAY operation, was able to activate a hormone amount sufficient to prevent gastric ulceration.

Methods. 120–150 g rats of our own breed kept on Sós's semi-synthetic diet were used in our experiments[13]. After 48 h of complete fasting—while given water *ad libitum*—the animals were subjected to SHAY's operation under ether anaesthesia and simultaneous intraduodenal HCl injections were given. The animals were decapitated 14 h after the operation. Their gastric content was examined quantitatively with regard to pH and total acidity, and from changes in the gastric mucosa, the ulcer index was determined. The following scheme was used in our calculations:

ulcer and perforation, resp.	of 10 mm diameter	20 points
ulcer	of 5 mm diameter	10 points
ulcer	of 2 mm diameter	5 points
ulcer	of 1 mm diameter	2 points

The points showing the changes in each stomach were added and divided with the number of animals in the group, and thus the value of the ulcer index was obtained.

Results. In the course of our experiments, the animals were divided into two groups. The first group was given simultaneously with the operation a 0.35% HCl solution at body temperature diluted with physiologic saline, and the other group received a 0.9% intraduodenal NaCl solution, 2 ml/100 body weight. The animals were killed in the 15th postoperative hour; their gastric content was subjected to chemical analysis, the results of which are shown in Figure 1.

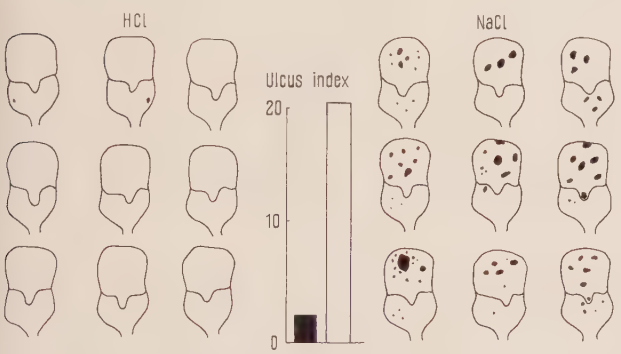


Fig. 1. Scheme of gastric mucosa and ulcer index of SHAY rats treated with intraduodenal HCl and NaCl, resp.

The amount of gastric secretion significantly decreased as compared to the controls; its pH value showed a definite rise and correspondingly the total acidity value dropped after the intraduodenal injection of HCl. The changes detectable on the gastric mucosa are schematically illustrated in Figure 2, and at the same time the value of the ulcer index is shown.

Following intraduodenal HCl injection, only one animal developed a minimal change on the gastric mucosa as can be seen in the Figure whereas serious ulceration was detectable in all of the controls.

It is further on considered noteworthy that, whereas following intraduodenal HCl injection the gastric content was markedly mucous and the surface of the gastric mucosa lubricious, the mucus was completely absent in the controls.

Discussion. SHAY is of the opinion that ulceration after placing a ligature on the pylorus is due to the digestive effect of the sour gastric content gathering because of the increased gastric secretion[10]. According to the French school, the ulcus is said to develop in consequence of the reflectoric vascular spasm elicited by pyloric ligation[14]. We are of the opinion that besides these two reasons the cessation of natural duodenal souring induced by placing a ligature on the pylorus also has a role, and so this ulcer may be considered as an outfall phenomenon of gastrointestinal parahormones. In our former studies, it was demonstrated that after intraduodenal HCl injection a functional capillary dilatation is established in the splanchnic vascular region and, due to electric stimulation of the splanchnic nerve, there is a significantly slighter elevation in blood pressure following duodenal souring than in the previous control period[15,16].

On the basis of all these facts, we presume that in the SHAY rat duodenal souring prevents, through functional capillary dilatation induced in the splanchnic area, the development of reflectoric vascular spasms arising after the ligation of the pylorus. Besides, the protective effect is explained also by the decreased gastric secretion brought about by duodenal souring.

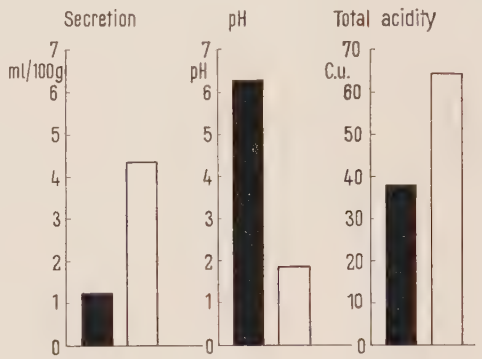


Fig. 2. Amount of gastric secretion, pH and total acidity value (C. u.: clinical unit = ml 0.1*n* NaOH/l gastric juice) in intraduodenally HCl (■) or NaCl (□) treated SHAY rats.

Résumé. L'acidification du duodenum pratiquée parallèlement à l'opération de Shay empêche totalement le développement de l'ulcus chez le rat. Les auteurs expliquent cet effet de la manière suivante: les parahormones activées gènent la sécrétion et la contraction de l'estomac et provoquent dans les vaisseaux splanchniques une vaso-dilatation fonctionelle. De ce fait, la vasoconstriction réflective qui suit la ligature du pylore ne peut pas se réaliser dans les parois de l'estomac.

T. GATI, F. GELENCSÉR, and L. SELMECI

Institute of Pathophysiology, University Medical School, Budapest (Hungary), October 19, 1960.

[13] J. Sós, *A kisérleti orvostudomány vizsgáló módszerei*, Vol. III (Akadémiai Kiadó, Budapest, 1959).

[14] A. LAMBLING, J. L. HARDOUIN, S. BONFILS, and R. LAUMONIER, Arch. Mal. app. dig. untr. *43*, 385 (1954).

[15] G. LUDÁNY, T. GÁTI, F. GELENCSÉR, and J. HIDEG, Pflügers Arch. ges. Physiol. *270*, 489 (1960).

[16] T. GÁTI, F. GELENCSÉR, J. HIDEG, and G. LUDÁNY, Ceskoslovenská Fysiologie *9*, 100 (1960).

Struktur-Wirkungsbeziehungen bei einigen Cardenoliden und Bufadienoliden nach verschiedenartigen Herzschädigungen

Untersuchungen über Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Herzglykosiden und Geninen wurden von DE GRAFF, CHEN, ROTHLIN u. a.[1–5] vorwiegend unter dem Gesichtspunkt einer Korrelation zwischen Wirkungsstärke und chemischer Struktur durchgeführt. Die strukturellen Veränderungen am Steroidkern, am Laktonring oder an der Zuckerkette, die zu einem Verlust der spezifischen Herzwirkung führen, sind heute weitgehend bekannt. KAHN und ACHESON[6] benutzten den Einfluss der Herzglykoside auf den Kationenaustausch menschlicher Erythrocyten und WOLLENBERGER[7] den Einfluss auf den Stoffwechsel als Modell, um eine spezifischere Aussage über strukturabhängige Unterschiede verschiedener herzwirksamer Stoffe machen zu können. Trotz der genannten Versuche hat bis heute – wie ROTHLIN[8] zusammenfassend bemerkt – die chemische Differenzierung der Glykoside vom experimentellen Gesichtspunkt aus noch wenig Beachtung gefunden; das alte Problem, ob man am Krankenbett immer mit einem Glykosid auskommt oder je nach Pathogenese der Erkrankung verschiedene Glykoside benutzen muss, ist noch ungeklärt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden am isolierten, spontan schlagenden Meerschweinchen-Vorhofpräparat akute Herzschädigungen ausgelöst, die biochemisch durch die Art ihrer Stoffwechselhemmwirkung, durch ihren Einfluss auf die energiereichen Phosphate (FÖRSTER und WAHLER[9]) oder auf den Kationengehalt des Herzmuskels (FÖRSTER)[10] und durch Untersuchungen von LÜLLMANN[11] auch elektrophysiologisch definiert sind. Diese experimentellen «Insuffizienzformen» des Herzens sollen Modelle für unterschiedliche klinische Herzerkrankungen darstellen, deren biochemische Pathogenese heute noch weitgehend unbekannt ist. Um Strukturbeziehungen zwischen der Anzahl und Stellung der OH-Gruppen am Steroidkern und der Bedeutung des 5- bzw. 6-C-Laktonringes kennenzulernen, untersuchten wir drei Paare einander entsprechender Cardenolide und Bufadienolide[12]. In Vorversuchen wurden deren äquieffektive Konzentrationen am ungeschädigten Vorhofpräparat bestimmt. Die Herzen wurden dann mit 2,4-Dinitrophenol (DNP), Chininsulfat oder Fluoressigsäure (FE) geschädigt. DNP

[1] A. C. DEGRAFF, G. H. PAFF und R. A. LEHMANN, J. Pharmacol. exp. Therap. *72*, 211 (1941).
[2] K. K. CHEN, F. G. HENDERSON und R. C. ANDERSON, J. Pharmacol. exp. Therap. *103*, 420 (1951).
[3] K. K. CHEN und F. G. HENDERSON, J. Pharmacol. exp. Therap. *111*, 365 (1954).
[4] E. ROTHLIN, Proc. of the Rudolf Virchow Med. Soc. in the City of New York *6*, 74 (1947).
[5] E. ROTHLIN, Triangel *1*, 1 (1952).
[6] J. B. KAHN, jr., und G. A. ACHESON, J. Pharmacol. exp. Therap. *115*, 305 (1955).
[7] A. WOLLENBERGER, *Herzglykoside und oxydativer Myokardstoffwechsel*, Bad Oynhausener Gespräche III am 31. 10. und 1. 11. 1958 über Herzinsuffizienz und Digitaliswirkungen, p. 121.
[8] E. ROTHLIN und R. BIRCHER, Ergebn. inn. Med. Kinderheilk., Neue Folge *5*, 457 (1954).
[9] W. FÖRSTER und B. E. WAHLER, Arch. exp. Path. Pharmak. *240*, 6 (1960).
[10] W. FÖRSTER, in Vorbereitung.
[11] H. LÜLLMANN, Arch. exp. Path. Pharmak. *237*, 447 (1959).
[12] Für die Überlassung von Versuchsmustern danke ich herzlich Herrn Prof. K. MEYER, Basel (Bufalin und Desacetylbufotalin), Herrn Priv.-Doz. Dr. TAMM, Basel (12-β-Oxybufalin), Herrn Dr. DÜBLER, Basel, Herrn Dr. BAUMGARTEN, Wernigerode (Digitoxigenin und Gitoxigenin) und Herrn Prof. THREN, Dresden (Digoxigenin).

	3,14-Dioxy-Verbindung		3,14,12-Trioxy-Verbindung		3,14,16-Trioxy-Verbindung	
	Digitoxigenin 3×10^{-7}	Bufalin 2×10^{-8}	Digoxigenin 2×10^{-6}	12-β-Oxybufalin 5×10^{-7}	Gitoxigenin 3×10^{-6}	Desacetylbufotalin 1×10^{-7}
	g/ml		g/ml		g/ml	
Ohne Schädigung						
Zunahme der Herzleistung	61% (9)	54% (12)	50% (11)	55% (11)	52% (11)	45% (12)
	← $P < 0{,}2$ →					
Schädigung mit 2,4-Dinitrophenol						
Abnahme der Herzleistung	70%	72%	66%	74%	74%	73%
Zunahme der Herzleistung	56% (11)	88% (6)	60% (9)	70% (8)	79% (9)	52% (11)
	← $P > 0{,}2$ →					
Schädigung mit fluoressigsaurem Na						
Abnahme der Herzleistung	31%	43%	35%	45%	22%	37%
	← $P > 0{,}05$ →					
Zunahme der Herzleistung	−16% (11)	−11% (12)	−7% (12)	0% (12)	−27% (12)	−17% (12)
	← $P > 0{,}05$ →		← $P > 0{,}05$ →		← $P > 0{,}05$ →	
	← $P > 0{,}01$ →					
			← $P < 0{,}001$ →			
Schädigung mit Chininsulfat						
Abnahme der Herzleistung	78%	81%	84%	80%	79%	80%
Zunahme der Herzleistung	7% (10)	0% (7)	11% (22)	32% (16)	1% (12)	8% (14)
	← $P > 0{,}2$ →		← $P < 0{,}001$ →			
Doppelte Geninkonzentration						
Abnahme der Herzleistung	80%	82%			76%	80%
Zunahme der Herzleistung	22% (25)	16% (30)			5% (42)	19% (49)
	← $P > 0{,}2$ →				← $P < 0{,}01$ →	

und Chinin verringerten in Konzentrationen von $3{,}75 \times 10^{-6}$ bzw. 2×10^{-5} g/ml die Herzleistung (berechnet in erg/min) um 75–80%. Die Fluoressigsäure dagegen verminderte die Herzleistung trotz hoher Konzentrationen (2×10^{-4} g/ml) und starker Abnahme des Gehaltes an energiereichen Phosphaten nur wenig (ca. 33%). Nach Geninzugabe stieg zwar bei Fluoressigsäureschädigung die Kontraktionshöhe an, gleichzeitig verminderte sich jedoch die Herzfrequenz so hochgradig, dass die Herzleistung – die im wesentlichen das Produkt aus Hubhöhe und Frequenz darstellt – nicht ansteigt.

Hubhöhe und Frequenz der Vorhofpräparate wurden mit Torsionsmyographen photokymographisch registriert. Der cardiotone Effekt wurde aus der Differenz zwischen der Herzleistung vor Zugabe des Cardenolid (das heisst zur Zeit der maximalen Herzschädigung) und dem Maximum der positiv inotropen Wirkung, ausgedrückt in Prozenten und bezogen auf den Ausgangswert vor der Schädigung, berechnet.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst.

Unabhängig von der Struktur der 6 Cardenolide und Bufadienolide führten äquieffektive Konzentrationen nach Herzschädigung mit 2,4-Dinitrophenol zu einer gleich starken Zunahme der Herzleistung. Nach Schädigung mit Fluoressigsäure dagegen sind die 3,14,12-Trioxyverbindungen stärker wirksam als die 3,14-Dioxy- ($P > 0{,}01$) und die 3,14,16-Trioxyverbindungen. Zwischen den einander entsprechenden 5- und 6-C-Laktonringderivaten war kein Unterschied nachweisbar. Nach Schädigung mit Chinin erhöhen bei den untersuchten Trioxyderivaten jeweils die Bufadienolide stärker die Herzleistung als die Cardenolide ($P < 0{,}01$). Ausserdem sind wieder die beiden 3,14,12-Trioxyderivate den 3,14,16-Trioxyverbindungen überlegen ($P < 0{,}02$ bzw. $P < 0{,}001$). Bei den 3,14-substituierten Verbindungen war zwischen 5- und 6-C-Laktonringderivat kein Unterschied nachweisbar ($P > 0{,}2$). Im Vergleich zu den 3,14,12-Trioxyverbindungen ist nur das Bufalin, nicht aber das Digitoxigenin den entsprechenden 3,14,12-Trioxyverbindungen unterlegen.

Mit der angegebenen Methode ist es möglich, an verschiedenen biochemisch und elektrophysiologisch definierten Herzschädigungsmodellen qualitative Unterschiede im Wirkungsmechanismus von Cardenoliden und Bufadienoliden in Abhängigkeit von Zahl und Stellung der OH-Gruppen und der Struktur des Laktonringes nachzuweisen.

Summary. By damaging isolated auricles of guinea pigs with 2,4-dinitrophenol, fluoroacetic acid or quinine, it was possible to obtain qualitative differences of effect depending upon the chemical structure of the cardenolids and bufadienolids.

W. Förster

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie Magdeburg (Deutschland), 10. November 1960.

The Incorporation of 8-^{14}C-Adenine and 8-^{14}C-Guanine into PNA of *Rhodospirillum rubrum*

A number of investigations have been carried out to determine the ability of micro-organisms, which do not require preformed purines for growth, to incorporate ^{14}C-adenine and ^{14}C-guanine into the purine bases of PNA. The results have revealed that they can be divided into two main groups: a) those which incorporate guanine into PNA-adenine and guanine, and adenine exclusively or mainly into PNA-adenine, and b) those which incorporate guanine exclusively or mainly into guanine, and adenine into both PNA purines (see e.g. Brown[1], Goodwin[2]); an example of a) is *Micrococcus pyogenes* v. *aureus* and of b) *Aerobacter aerogenes*. The photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* had not previously been examined in this respect, so as part of our studies on purine metabolism in this organism we undertook such an investigation.

R. rubrum was cultured anaerobically in the light under our standard conditions (Goodwin and Osman[3]) and the 8-^{14}C-purine added to 48 h cultures. The cells were harvested 6 h later, washed repeatedly with 80–90% ethanol, ethanol-ether (1:1) and finally ether, and extracted twice with 10% aqueous NaCl (7 ml/1 g dry weight cells) under reflux at 100° for 1 h. The pooled extract was cooled to 0° and the crude PNA precipitated by addition of 2 vol of absolute ethanol previously cooled to 0°. Purified PNA was then obtained via its Ba salt by the method of Magasanik[4]. It was then hydrolysed with N HCl in a sealed glass tube and the products of the reaction (adenine, guanine, cytidylic acid and uridylic acid) separated on paper using the *t*-butanol/HCl/H_2O solvent of Smith and Markham[5]. The purine spots were eluted with 0.1 N HCl and the amount present determined spectrophotometrically; the eluates were then assayed for ^{14}C with a conventional end-window counter.

Results.

Ratio of guanine to adenine in R. rubrum PNA. Ten determinations on four different samples of purified *R. rubrum* PNA gave a mean value of 1.23 (range 1.15–1.34) for the molar ratio of guanine to adenine. This should be compared with values for the RNA of other bacteria, for example, 1.54, 1.47, and 1.14 for *S. marcescens*, *Mycobact. phlei* and *Escherichia coli*, respectively (Elson and Chargaff[6]).

Incorporation of 8-^{14}C-adenine and 8-^{14}C-guanine into R. rubrum PNA. Representative results for 8-^{14}C-adenine and 8-^{14}C-guanine incorporation into *R. rubrum* PNA are given in the Table. From these results it is clear that *R. rubrum* falls into class b) discussed above, because it incorporates adenine into both PNA-purines, and guanine almost exclusively into PNA-guanine. This would suggest that if the generally accepted pathway for purine interconversions in micro-organisms (Goodwin[2]) is also applicable to *R. rubrum*, then the enzyme carrying out the reductive deamination of guanylic acid (GMP to inosinic acid (IMP) is absent.

There is a very active adenine deaminase present in *R. rubrum* which, on a millimolar scale, converts adenine quantitatively into hypoxanthine which is itself not utilized by the organism (Goodwin and Passorn[7]). This

[1] G. B. Brown, in *The Nucleic Acids* (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic Press, New York 1955), Vol. II.
[2] T. W. Goodwin, *Recent Advances in Biochemistry* (Churchill, London 1960).
[3] T. W. Goodwin and H. G. Osman, Biochem. J. *53*, 541 (1953).
[4] B. Magasanik, in *The Nucleic Acids* (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic Press, New York 1955), Vol. I.
[5] J. D. Smith and R. Markham, Biochem. J. *46*, 509 (1950).
[6] D. Elson and E. Chargaff, Biochim. biophys. Acta *17*, 367 (1955).
[7] T. W. Goodwin and P. N. A. Passorn, Nature (Lond.), in press (1961).

accounts for the very low incorporation of 8-^{14}C-adenine (about 1%) into PNA compared with the incorporation of 8-^{14}C-guanine (about 50%) under the same conditions. Obviously with micromolar quantities, as used in these isotope experiments, small amounts of adenine, or hypoxanthine, do become incorporated; these would be undetectable with the concentrations used in the enzyme experiments.

Incorporation of 8-^{14}C-adenine and 8-^{14}C-guanine into *Rhodospirillum* PNA. (8-^{14}C-adenine added as adenine sulphate hemihydrate (S.A. 0.025 mC/mg) and 8-^{14}C-guanine added as the free base (S.A. 0.016 mC/mg). Each result is the mean of 4 determinations).

Counts added (cpm)	Counts in PNA (cpm)	Specific Activity (cpm/μM)		Ratio A/G
		Adenine	Guanine	
1. 195×10^3 (8-^{14}C-adenine)	2.09×10^3	4720	2440	1.94:1
2. 521×10^3 (8-C^{14}-guanine)	256×10^3	720	10400	0.07:1

Zusammenfassung. Das molare Verhältnis von Guanin zu Adenin in PNA von *R. rubrum* ist 1,23. Ganze Zellen von *R. rubrum* verbinden sich mit ^{14}C-Adenin in gleichem Mengenverhältnis zu PNA-Adenin und -Guanin, mit ^{14}C-Guanin aber fast ausschliesslich zu PNA-Guanin.

T. W. GOODWIN and P. N. A. PASSORN

Department of Agricultural Biochemistry, University College of Wales, Aberystwyth (England), January 23, 1961.

Effect of some Hyper- and Hypo-Cholesteremic Drugs on the Cholesterol Biosynthesis by Liver Homogenates

There are some compounds that are capable of affecting the biosynthesis of cholesterol both *in vivo* and in liver slices, but whose mechanism of action has still not been identified.

Intravenous injection of Triton WR 1339 (arylalkylpolyether of phenol, Rohm & Haas, Inc., Philadelphia) has been shown to produce a rise in serum cholesterol[1,2] and FRANTZ and HINKELMAN[3] and BUCHER[4] found that hepatic cholesterol synthesis is accelerated 24 h after intravenous administration of Triton in rat.

Phenylethylacetic acid and its derivatives are known to produce a reduction in serum cholesterol of the hypercholesteremic animals and in the cholesterol biosynthesis of liver slices from acetate[5].

In order to ascertain whether any of these drugs may directly affect the metabolic pathways of cholesterol *in vitro* or whether they need the presence of the living cell, their effect on liver homogenates has been tested.

Materials and methods. A 30% rat liver homogenate containing the following in a volume of 2.5 ml, according to FRANTZ and BUCHER[6], is used: 0.08 *M* potassium phosphate buffer, pH 7.4, 0.03 *M* nicotinamide, 0.0048 *M* $MgCl_2$, 0.0008 *M* DPN, and 0.016 *M* sodium acetate. Three ml of the homogenate are distributed in two sets of 6 glass-stoppered 25 ml tubes. The first set (A) is added with 1 ml assay solution, the latter (B) with 1 ml water. All the tubes are sealed with 100% O_2 and maintained at 37°C for 2 h with shaking.

3 ml of the same homogenate are mixed in a third set of 6 tubes as control (C) with 1 ml water and 1 ml of assay solution.

Total cholesterol prior to incubation is determined according to Bloor.

At the end of incubation 1 ml of water to A and 1 ml of assay solution to B are added and immediately total cholesterol is determined from both the sets of tubes. pH values of all the tubes with and without assay solution at the end of experiment are controlled to be constant within $\pm$ 0.04.

Results. The mean cholesterol contents of liver homogenates in a typical experiment with Triton as assay solution are:

A) After incubation with Triton (final concentration in each tube 50 mg/ml): 249 mg%.

B) After incubation without Triton: 251 mg%.

C) Prior to incubation (control): 227 mg%.

Statistical analysis of the difference between the means B and C shows that incubation at 37°C stimulates a significant cholesterol biosynthesis from acetate in the liver homogenates at the rate of 10.6% (Student's t for 10 degrees of freedom = 3.69; $P < 0.01$). Triton is not capable to produce a rise in the rate of cholesterol biosynthesis at concentrations in the medium between 1 mg and 50 mg/ml.

Of the hypocholesteremic drugs phenylethylacetic acid (PEA), diphenylylethylacetic acid, 3-methyl-4-phenyl-3-butenoic acid (methylphenylvinylacetic acid[7]) and 2-methyl-4-phenylbutanoic acid (methylphenylbutyric acid[7]) have been tested.

The mean results of a typical experiment with sodium PEA as assay solution are: A) After incubation at 37°C with sodium PEA (final concentration in each tube 6 mg/ml): 237 mg%. B) After incubation at 37°C without sodium PEA: 240 mg%. C) Prior to incubation (control): 212 mg%.

Statistical analysis of the difference between the means B and C shows a significant Student's t (t for 10 degrees of freedom = 3.18; $P < 0.01$). In these experiments no inhibitory effect of PEA on the cholesterol biosynthesis by liver homogenates was evident at concentrations between 1 and 100 μM. Similar results were obtained in testing the other hypocholesteremic drugs mentioned.

Riassunto. Nè il Triton W R 1339 nè l'acido feniletilacetico sono capaci di modificare significativamente la biosintesi di colesterolo da parte di omogenati di fegato di ratto incubati a 37°C.

V. SCARSELLI and A. FOSSATI

Istituto biochimico italiano, Milano (Italy), November 18, 1960.

1 A. KELLNER, J. W. CORREL, and A. T. LADD, J. exp. Med. *93*, 373 (1951).
2 A. KELLNER, J. W. CORREL, and A. T. LADD, J. exp. Med. *93*, 385 (1951).
3 I. D. FRANTZ and B. T. HINKELMAN, J. exp. Med. *101*, 225 (1955).
4 N. L. R. BUCHER, J. biol. Chem. *234*, 262 (1959).
5 S. GARATTINI, P. PAOLETTI, and R. PAOLETTI, Arch. int. Pharmacodyn. Therap. *117*, 114 (1958).
6 I. D. FRANTZ and N. L. R. BUCHER, J. biol. Chem. *206*, 471 (1954).
7 V. SCARSELLI, Il Farmaco, in press.

Total Synthesis of two Cyclodecapeptides Exerting Polymyxin-like Activity

Recently we reported the syntheses of the cyclic decapeptides 8γ[1–3] and 8α[4] possessing two of the four possible structures[5] suggested for the natural antibiotic polymyxin B_1 (Fig.).

In view of their low *in vitro* antibacterial activity against *Brucella bronchiseptica* ATCC 4617[6] 8γ[3] and 8α[4] are not identical with the natural product.

We now report the synthesis of the two cyclic variants 7γ and 7α from their open-chain protected decapeptides one of which has already been described[7]. Cyclization and purification could be performed in the same way as indicated for the synthesis of the two cyclopeptides with 8 amino acids in the ring[3,4]. Both synthetic antibiotics 7α and 7γ were characterized as cyclic peptides by dinitrophenylation[8] and subsequent total hydrolysis, when as expected only γ-DNP-α,γ-diamino-butyric-acid was obtained. Leucine although being *N*-terminal in the open decapeptide stage before cyclization, was not obtained as DNP derivative.

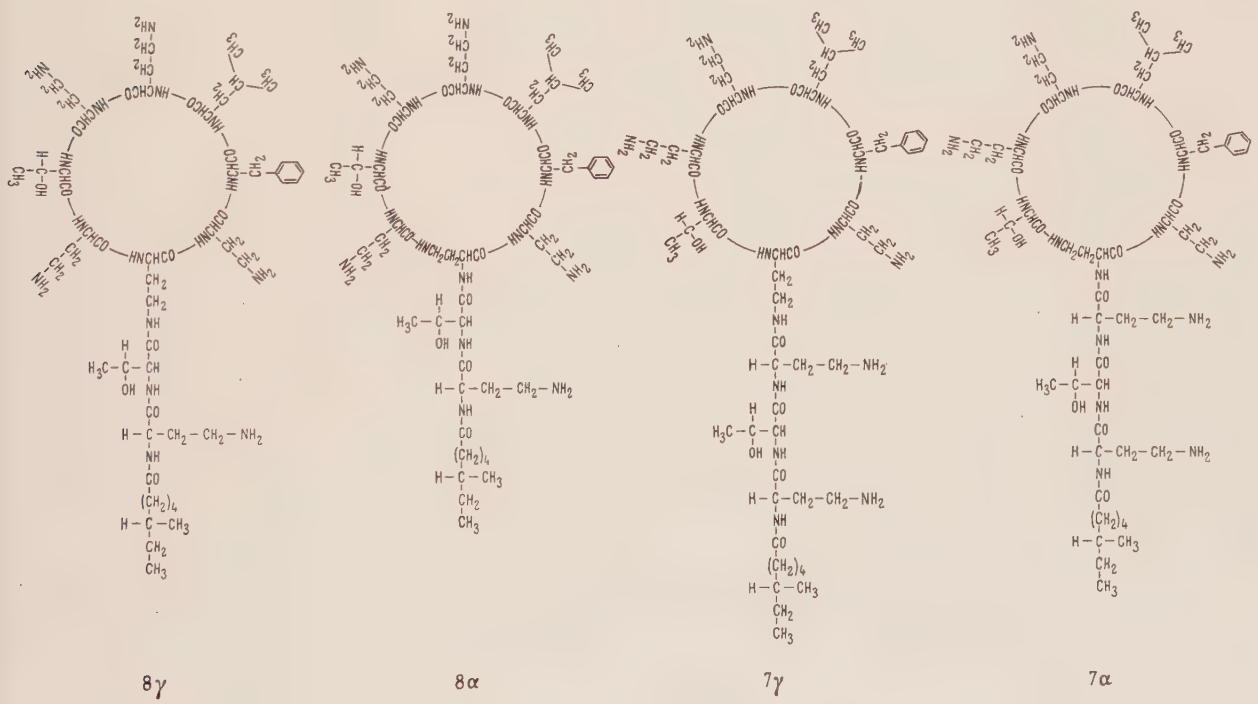
A careful microbiological study of all synthetic variants *in vitro* and *in vivo* (see Table), showed the isomers with 7 amino acids in the ring structure to be highly active polymyxin-like antibacterial agents. Although complete purity has so far not been established, 7γ is more potent against *E. coli* than 7α, especially *in vivo*.

On the basis of microbiological experiments natural polymyxin seems to have the structure 7γ rather than 7α. For the moment, however, we are not able to decide unequivocally between these two structures. Further chemical and microbiological characterization will, as we hope, finally lead to a clear-cut decision.

Full details will be published in Helvetica chimica Acta.

[1] The following abbreviations[3] for the four decapeptide isomers were used throughout this paper:
8γ = ring of 8 amino acids and γ-connected side chain.
8α = ring of 8 amino acids and α-connected side chain.
7γ = ring of 7 amino acids and γ-connected side chain.
7α = ring of 7 amino acids and α-connected side chain (see Fig.)

[2] K. Vogler, P. Lanz, and W. Lergier, Exper. *15*, 334 (1959).
[3] K. Vogler, R. O. Studer, W. Lergier, and P. Lanz, Helv. chim. Acta *43*, 1751 (1960).
[4] R. O. Studer, K. Vogler, and W. Lergier, Helv. chim. Acta *44*, 131 (1961).
[5] W. Hausmann, J. Amer. chem. Soc. *78*, 3663 (1956). – G. Bizerte and M. Dautrevaux, Bull. Soc. Chim. biol. *39*, 795 (1957).
[6] D. C. Grove and A. Randall, *Assay Methods of Antibiotics* (Medical Encyclopedia Inc., New York 1955), p. 86.
[7] R. O. Studer, K. Vogler, and W. Lergier, Chimia *14*, 422 (1960).
[8] F. Sanger, Biochem. J. *39*, 507 (1945).
[9] D. M. Wintermere, W. H. Eisenberg, and A. B. Kirshbaum, Antibiotics and Chemotherapy *7*, 189 (1957).
[10] B. Fust and E. Böhni, Antibiotic Medecine and Clinical Therapy *6*, Suppl. 1, 3 (1959).



8γ 8α 7γ 7α

Microbiological activity of the four synthetic isomers 8γ, 8α, 7γ, and 7α in comparison with natural polymyxin B_1. Standard deviation ± 20%

	8γ		8α		7γ		7α		*Polymyxin* B_1 (Pentahydrochloride)[3]	
Brucella bronchiseptica ATCC 4617 (*in vitro*)	900	E/mg	800	E/mg	5333	E/mg	5148	E/mg	5346	E/mg
Pseudomonas aeruginosa (*in vitro*)[9]	322	E/mg	396	E/mg	5325	E/mg	5280	E/mg	5140	E/mg
Escherichia coli ATCC 10536[9] (*in vitro*)	241	E/mg	184	E/mg	4185	E/mg	3381	E/mg	5686	E/mg
Escherichia coli 1346[10] (mice) CD_{50} s.c.	⩾ 7	mg/kg	⩾ 7	mg/kg	~ 0.8	mg/kg	1.4	mg/kg	0.8	mg/kg

Zusammenfassung. Von den vier Cyclodekapeptiden, die als mögliche Strukturen für Polymyxin B_1 vorgeschlagen wurden, konnten nun auch die Ringstrukturen mit 7 Aminosäuren, nämlich 7 γ und 7 α (vgl. Fig.), synthetisiert werden. Diese erwiesen sich im Gegensatz zu 8 γ und 8 α als hochaktive antimikrobielle Wirkstoffe mit Wirkungsqualitäten der Polymyxine. Ob 7 γ oder 7 α mit natürlichem Polymyxin B_1 identisch ist, wird durch weitere Versuche abgeklärt.

K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER, and ERIKA BÖHNI

Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel, March 8, 1961.

Influence of Isoniazid and p-Aminosalicyc Acid on Plasma 17-Hydroxycorticosteroids in Guinea Pigs

Earlier publications reported that the antituberculotics isoniazid (INH) and *p*-aminosalicyc acid (PAS) produce many effects similar to those noted following the administration of adrenocorticotrophin (ACTH). In the animal experiments, after the administration of large doses either of isoniazid or of PAS, histological changes in adrenals, depletion of adrenal ascorbic acid and cholesterol and eosinopenia occured[1–4]. In the present paper we were interested to find out how the level of plasma 17-hydroxycorticosteroids (17-OHCS) in guinea pigs is influenced in the course of treatment with INH and PAS.

In experiments, male guinea pigs weighing 300–400 g were used. The compounds tested were administered *per os* in water solution. The animals were divided into groups. The first group of animals received 100 mg INH/kg per day and the second group was treated with 1 g PAS/kg per day for a period of 1–10 days. The animals were sacrificed and bled in heparinized test tubes on the first, third, fifth, tenth day, 3 h after administration. Control animals were treated identically except that they received no INH and PAS. Plasma 17-OHCS concentrations were determined by the method of SILBER and PORTER[5].

Table I summarizes the data concerning the effects on plasma 17-OHCS of INH administered in the dose of 100 mg/kg. It can be seen that even one dose caused a 9% increase of plasma 17-OHCS, but this was not significant. In the course of three and five days' treatment, INH produced a highly significant elevation of plasma 17-OHCS. On the third day the mean increase was 52% and on the fifth day 127% ($P < 0.01$).

Table II shows the concentration of plasma 17-OHCS in guinea pigs following the administration of 1 g PAS/kg. After one dose of PAS, no elevation in plasma 17-OHCS was found. Three days' administration resulted in 36% increase of plasma 17-OHCS ($P < 0.05$). This increase was augmented further in five days' treatment to 56% and in ten days to 130% if compared with the control group ($P < 0.01$).

On the third day, INH already exerted a higher effect on plasma 17-OHCS than PAS. The more evident difference between the effects of antituberculotics was found on the fifth day. The mode of application seems also to be important. GOOD et al.[6] ascertained higher effect on plasma 17-OHCS after the intraperitoneal administration of sodium salicylate than after oral administration.

Very interesting is the question of whether the stimulatory effect of antituberculotics on the adrenal cortex is mediated by anterior hypophysis. CAUWENBERGE[1] did not find in hypophysectomized PAS-treated rats the depletion of adrenal ascorbic acid and cholesterol. From these experiments it seems that PAS does not stimulate the adrenal cortex directly. INH, on the other hand, following the administration of higher doses, may stimulate the adrenal cortex even in hypophysectomized rats and produce the depletion of adrenal ascorbic acid[2]. Although the adrenal ascorbic acid depletion may show the function of adrenal cortex, a direct measurement of plasma 17-OHCS would be preferable.

Tab. I. Effects of orally administered 100 mg INH/kg on plasma 17-OHCS in guinea pigs

	Number of animals	Plasma 17-OHCS Mean µg/100 ml	SE		Increase %
Control group	10	92	4.8		
INH treated					
day 1	8	100	9.9	$P < 0.2$	9
day 3	7	140	10.2	$P < 0.01$	52
day 5	6	209	5.5	$P < 0.01$	127

Tab. II. Effects of orally administered 1 g PAS/kg on plasma 17-OHCS in guinea pigs

	Number of animals	Plasma 17-OHCS Mean µg/100 ml	SE		Increase %
Control group	10	92	4.8		
PAS treated					
day 1	6	92	7.4		
day 3	5	125	12.5	$P < 0.05$	36
day 5	5	144	16.3	$P < 0.01$	56
day 10	6	211	14.2	$P < 0.01$	130

From our results it can be concluded that the treatment with high doses, either of INH or of PAS, produced a marked effect on circulating 17-OHCS. These results are in correlation with our findings[7] of the depletion of adrenal ascorbic acid and cholesterol in rats treated with INH or PAS for 14 days.

Zusammenfassung. Bei zehntägiger Verabreichung von 1 g PAS/kg oder 100 mg INH/kg peroral kommt es bei Meerschweinchen zu einer signifikanten Steigerung der 17-Hydroxy-corticosteroide. Eine ausgeprägte restimulierende Wirkung wurde im Fall von INH beobachtet. Der Unterschied fiel besonders am fünften Tag auf, wobei nach INH-Gabe die Steigerung zirkulierender Corticosteroide im Vergleich zur PAS verdoppelt war.

M. KOHOUT and R. KRULÍK

Tuberculosis Research Institute, Prague (Czechoslovakia), November 9, 1960.

1 H. CAUWENBERGE, Lancet *1951/II*, 686.
2 L. EIDUS and J. NURIDSÁNY, Acta Physiol. Hung. *10*, 101 (1956).
3 G. VELTMAN, Ärztl. Wschr. *10*, 751 (1955).
4 T. FRAWLEY and P. ROSCH, Amer. Rev. Tuberc. *70*, 841 (1954).
5 R. H. SILBER and C. C. PORTER, J. biol. Chem. *210*, 923 (1954).
6 T. A. GOOD et al., Metabolism *6*, 346 (1957).
7 M. KOHOUT and R. KRULÍK, Rozhl. Tuberk. *20*, 4 (1960).

Catecholamine Content of the Arterial Walls in Experimental Hypertension

The pathogenesis of the vascular lesions occurring in hypertensive disease is an unsolved problem. Among the different theories concerning this question, the assumption of RAAB[1] should be mentioned, according to whom the changes in the catecholamine content of the blood vessels may play a significant role in the development of hypertensive vascular disease.

In the following set of experiments, the consequences of long standing hypertension were studied. Hypertension was produced in adult mongrel dogs by clamping one renal artery, according to GOLDBLATT. The blood pressure of the animals was controlled by direct arterial puncture during the next months. After an interval of 3–8 months, the animals were sacrificed and the catecholamines of different arterial segments were determined, using the EULER-FLODING reaction, as described previously[2].

In one group of animals, the GOLDBLATT-technique was successful: the systolic blood pressure rose to 170–190 mm Hg. These animals gave the results summarized in Table I. It can be seen that the adrenaline concentration increased in all the arteries studied, while the noradrenaline concentrations were lower than the corresponding figures in normal dogs. According to statistical analysis, these changes are highly significant. The percentage of adrenaline in relation to the sum of the two catecholamines increased consequently from 5–8% of normal canine arteries to 15–42%.

In some animals, the clamping of one renal artery was not followed by a lasting hypertension. The adrenaline concentration was also elevated in some arteries of these animals, but not in others; the noradrenaline concentration was not changed significantly (Table II). Comparing the results obtained in the two groups of operated animals, it can be seen that the adrenaline concentration is of the same order of magnitude, while the noradrenaline concentration is much lower in the hypertensive dogs.

Since the adrenaline concentration of the blood was found to be elevated in the hypertensive dogs (4–5 μg/l vs. 0.5–2.5 μg/l in normal controls), it may be supposed that the increased adrenaline concentration of the arteries was derived from the blood stream[3]. It is probable that substances liberated from the ischamic kidney are the causative agents in the increased production of adrenaline. From our data, we may conclude that the increase of arterial wall adrenaline is not in causative relation to the establishment of a lasting hypertension. There is no acceptable explanation at present for the decrease of the noradrenaline concentration seen in the arteries of the hypertensive dogs.

Zusammenfassung. In Hunden mit GOLDBLATT-Hypertonie ist die Adrenalinkonzentration der Arterien stark erhöht, diejenige von Noradrenalin aber – verglichen mit den Werten der Kontrolltiere – erniedrigt. Die Adrenalinerhöhung in der Arterienwandung ist wahrscheinlich nicht die Ursache des Hochdruckes, da sie auch in Hunden ohne postoperative Blutdruckerhöhung gefunden wurde.

I. FAREDIN, A. BENKÖ, M. WINTER, and A. BOTOS

1st Department of Medicine and 1st Department of Surgery, University Medical School, Szeged (Hungary), January 16, 1961.

[1] W. RAAB, Amer. J. Cardiol. *1*, 133 (1958).
[2] I. FAREDIN, M. WINTER, B. TANOS, and G. HETÉNYI, Exper. *15*, 389 (1959).
[3] W. RAAB and W. GIGEE, Angiology *9*, 283 (1958).

Tab. I. Results in hypertensive dogs

	Number of dogs	Adrenaline (A) conc.	Noradrenaline (NA) conc.	Sum of A + NA	% of A
Femoral artery	8	0.096 ± 0.022	0.131 ± 0.026	0.227 ± 0.048	42.3
		(0.039 ± 0.005	0.470 ± 0.072	0.509 ± 0.077	7.6)
Carotid artery	8	0.126 ± 0.015	0.427 ± 0.090	0.553 ± 0.105	22.8
		(0.056 ± 0.006	1.112 ± 0.129	1.168 ± 0.135	4.8)
Renal artery	7	0.305 ± 0.066	0.512 ± 0.160	0.817 ± 0.226	37.3
		(0.073 ± 0.007	1.445 ± 0.221	1.518 ± 0.228	4.8)
Coeliac artery	9	0.207 ± 0.030	0.647 ± 0.140	0.854 ± 0.170	24.2
		(0.075 ± 0.011	1.440 ± 0.284	1.515 ± 0.295	4.9)
Abdominal aorta	7	0.112 ± 0.021	0.295 ± 0.082	0.407 ± 0.103	27.5
		(0.093 ± 0.015	1.368 ± 0.305	1.461 ± 0.320	6.3)

Mean values and standard deviations of catecholamine concentrations in μg/g tissue wet weight. In parentheses corresponding values of 10 normal animals are given.

Tab. II. Results in operated dogs failing to increase their blood pressure

	Number of dogs	Adrenaline (A) conc.	Noradrenaline (NA) conc.	Sum of A + NA	% of A
Femoral artery	3	0.058 ± 0.014	0.607 ± 0.077	0.665	8.7
Carotid artery	2	0.141 ± 0.045	0.777 ± 0.319	0.918	15.3
Renal artery	3	0.179 ± 0.031	1.388 ± 0.304	1.567	11.4
Coeliac artery	2	0.186 ± 0.061	2.105 ± 0.275	2.291	8.1
Abdominal aorta	3	0.106 ± 0.012	0.759 ± 0.282	0.865	12.2

Mean values and standard deviations of catecholamine concentrations in μg/g tissue wet weight.

Changes in Proline and Hydroxyproline in Collagens during the Development of Rats

In 1950 NEUMAN and LOGAN[1] proved that the amount of hydroxyproline in collagen proteins isolated from different mammals, as well as from avian tissues, is the same and reaches 13.4 ± 0.24 weight%. Their similar amino acid composition was further established with the aid of detailed amino acid analysis of different collagens soluble in acid, neutral or alkali medium and insoluble collagen. The ratio of proline to hydroxyproline varies between 1.5 and 1.1[2–6]. The majority of the analyses mentioned were done on collagens isolated from adult animals. Nevertheless, BOUCEK et al.[7] did not show changes in hydroxyproline concentration in collagen isolated from subcutis of 1–70 years old men, 100 days after the implantation of polyvinyl sponge. MITOMA et al.[8] found that gelatine prepared according to LOWRY et al.[9] from chick embryos or from carrageenan granuloma from subcutis of guinea pigs, contains proline and hydroxyproline in concentrations typical for commercial gelatine.

In 1956 CHVAPIL[10,11] found that, in collagen extracted by repeated extraction of lung tissue homogenate by diluted alkali[1], the amount of hydroxyproline significantly increased during the ageing of rats: collagen from 2–18 days old rats amounted approximately to 6% of hydroxyproline whereas in collagen from adult rats about 13–14% of hydroxyproline was found.

Finally, according to HALL and REED[12], the amount of hydroxyproline in collagen from skin of people from 7 to 89 years is relatively stabile with a rather decreasing trend in the course of ageing.

In this communication, we summarise our experimental proofs that in collagens prepared by two different chemical procedures, as well as in non-modified, native collagen from rat tail tendon, the amount of hydroxyproline increases especially in the early postnatal period; the content of proline does not change.

We isolated collagen proteins from lungs of six age groups of rats: 4, 9, 14, 30, 40, 60 and 240 days old:

1. by the method of LOWRY, GILLIGAN and KATERSKY[9]. Using dilute alkali extraction (0.1 N-NaOH) so that all alkali non-collagen proteins are removed and the scleroproteins (insoluble collagen and elastin) remain.

2. By the extraction of lung homogenate with boiling 0.3 *M* trichloracetic acid, according to FITCH, HARKNESS, and HARKNESS[13], we obtain all tissue collagens. In hydrolysed samples of collagen (6 N-HCl, 140°C, 3 h), we determined hydroxyproline[14], proline[15], and nitrogen[16]. In samples of scleroproteins we determined the content of elastin using the original procedure of LOWRY et al.[9].

The results of proline and hydroxyproline determination expressed in weight% of collagen or in % of protein nitrogen (Tab. I) show that the concentration of proline in insoluble collagen remains the same during ageing of rats, whereas the concentration of hydroxyproline gradually increases. For instance insoluble collagen from 4 days old rats amounts to one third of hydroxyproline content of collagen from adult animals. The ratio proline-hydroxyproline is gradually decreasing from 3:1 to magnitudes presented in literature for mature collagens (1.1–1.6). That means that during 30 days of postnatal period in rats, the collagens mature into a structure identical with collagens of adult animals as far as the content of imino acids is concerned.

There is no doubt that extraction of collagen by dilute alkali attacks its structure. GROSS[17] proved that the crystalline ultra-structure, typical for collagen, is replaced by amorphous patterns. Further, it is well known that the

Tab. I. Changes in proline and hydroxyproline content in collagen from lungs during the ageing of rats. Collagen was isolated by the method of LOWRY et al.[9]

Age of rats (in days)	Amino acid g/100 g of collagen		Proline/ Hydroxy-proline	Amino acid g/100 g N		Proline/ Hydroxy-proline
	Proline	Hydr-oxy-proline		Proline	Hydr-oxy-proline	
4	13.5	4.6	2.9	11.4	3.8	3.0
9	14.2	6.7	2.1	9.8	4.3	2.3
14	14.2	6.7	2.1	11.6	4.9	2.3
30	13.5	8.7	1.5	10.9	7.5	1.4
60	12.5	7.5	1.7	10.2	7.2	1.4
250	12.4	11.8	1.05	–	–	–

Tab. II. Proline and hydroxyproline content in chemically non-modified collagen fibres from rat tail tendon in 12 days old and adult rats

Sample	% N	Amino acid g/100 g of protein		Amino acid g/100 g N of protein	
		Proline	Hydr-oxy-proline	Proline	Hydr-oxy-proline
Collagen from rat tail tendon 12 days old	17.0	18.6	7.6	11.0	5.7
Collagen from lungs of 12 days old rats isolated by LOWRY et al.[9]	14.2	18.4	6.9	7.8	5.0
Collagen from rat tail tendon 250 days old	–	18.8	10.9	–	–
Gelatine DGF	18.5	18.8	13.2	10.1	7.1

[1] R. E. NEUMAN and M. A. LOGAN, J. biol. Chem. *186*, 549 (1950).
[2] A. A. DENISOVÁ and L. ZAIDES, Doklady akademii nauk USSR *114*, 1287 (1957).
[3] J. E. EASTOE, Biochem. J. *61*, 589 (1955).
[4] K. A. PIEZ and R. C. LIKINS, in *Calcification in Biological Systems*, by the American Association for the Advancement of Science (Washington, D.C. 1960), p. 411.
[5] J. H. BOWES, R. G. ELIOT, and J. A. MOSS, Biochem. J. *61*, 143 (1955).
[6] G. R. TRISTRAM, *The Proteins* (Edited by H. NEURATH and K. BAILEY, Academic Press, New York), vol. I A, p. 221.
[7] R. J. BOUCEK, N. L. NOBLE, KUNG-YING, T. KAO, and H. R. ELDEN, J. Gerontol. *13*, 2 (1958).
[8] CH. MITOMA, T. S. SMITH, F. FRIEDBERG, and C. R. RAYFORD, J. biol. Chem. *234*, 78 (1959).
[9] O. H. LOWRY, D. R. GILLIGAN, and E. M. KATERSKY, J. biol. Chem. *139*, 795 (1941).
[10] M. CHVAPIL, Physiol. Bohemoslovenica *5*, 421 (1956).
[11] V. KOBRLE and M. CHVAPIL, Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. *16*, 526 (1958).
[12] D. A. HALL and R. REED, Nature *180*, 243 (1957).
[13] S. M. FITCH, M. L. R. HARKNESS, and R. D. HARKNESS, Nature (Lond.) *176*, 163 (1955).
[14] H. STEGEMANN, Z. physiol. Chem. *311*, 41 (1958).
[15] F. P. CHINARD, J. biol. Chem. *199*, 91 (1952).
[16] E. J. CONWAY, *Microdiffusion Analysis* (London 1957).
[17] J. GROSS and B. DUMSHA, Biochem. biophys. Acta *28*, 268 (1958).
[18] H. HÖRMANN, *Beiträge zur Silikoseforschung*, Sonderband II, 619 (1958).

proportion of soluble collagens in collagen fibre decreases during ageing[18]. This leads to the presumption of the splitting of a soluble collagen containing a higher concentration of hydroxyproline than the remaining insoluble collagen. HALL[19] actually reports that alkali soluble collagen from hide powder contains in a particular fraction an extremely high concentration of hydroxyproline (till 38 weight%). But this is in contradiction with the abovementioned analysis of soluble collagens[2–5].

To elucidate this discrepancy, we extracted all collagens from lung tissue using hot trichloracetic acid and the concentration of proline, and hydroxyproline was referred to the amount of nitrogen in extract. We found that, in lung extracts from various age groups of rats, the proline concentration does not change whereas the concentration of hydroxyproline is more than double during ageing: proline-hydroxyproline ratio amounts in collagens from 9 days old rats to 4.3; in 14 days old rats to 3.7; 30 days old rats to 3.0; 40 days old rats to 2.1; 60 days old rats to 1.6.

This increase in hydroxyproline concentration in collagen during ageing is not inherent to collagens extracted from organs only but to all forms of collagens in maturing rats. In Table II we present the results of analysis of chemically non-modified collagen fibers prepared mechanically from tail tendon of newborn and adult rats. In very young rats, the collagen fibre contains significantly less hydroxyproline than in collagen fibre from adult animals. The concentration of proline was the same in different samples, without regard to the age of the animals.

We suppose, therefore, that in early stages of development of rats the non-mature collagen is formed by a different aminoacid composition than is found in matured collagen. It is not yet clear how the maturation is realized, namely by which means the increase of hydroxyproline in collagen molecule occurs. It is worth mentioning that in peptides containing hydroxyproline isolated from different animal tissues[20], we found similar changes in the ratio of proline to hydroxyproline.

Zusammenfassung. Durch Bestimmung des Prolin- und Hydroxyprolingehaltes in unlösbarem Kollagen und in den gesamten Kollagenen der Lunge von Ratten verschiedenen Alters wurde bewiesen, dass in der frühen postnatalen Epoche der Ratte (bis zu 30 Tagen) die Menge des Hydroxyprolins im Kollagen eindeutig steigt, während sich die Menge des Prolins praktisch nicht ändert.

M. CHVAPIL and V. KOBRLE

Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Prague (Czechoslovakia), December 12, 1960.

[19] D. A. HALL, Exper. Suppl. *4*, 19 (1956); Gerontologia (Basel) *1*, 347 (1957).

[20] V. KOBRLE and M. CHVAPIL, Nature, in press.

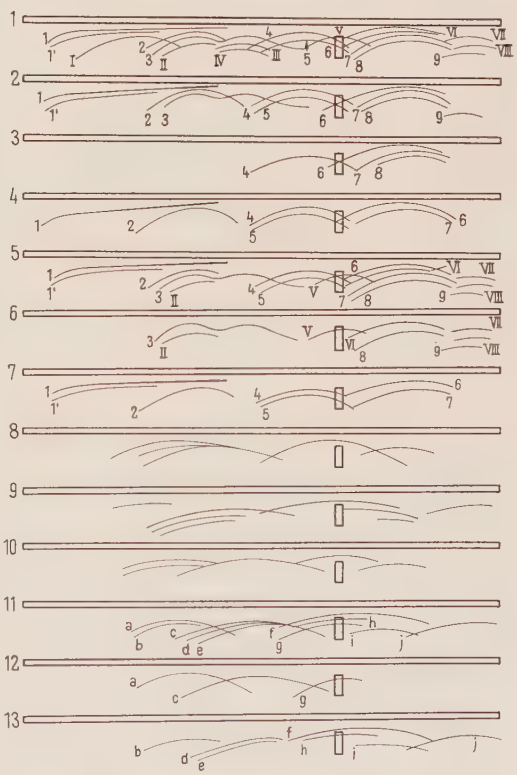
The Relation between some Serum and Liver Proteins in Rats Studied by Immunoelectrophoresis and by Ouchterlony's Double Diffusion Method

We investigated the relation between liver and serum proteins in rats both by immunoelectrophoresis[1,2] and by the double diffusion method in agar[3] with the technique of transferring agar discs with the isolated fractions[4].

The experiments were carried out with serum, liver homogenate and extracts from livers washed *in situ* from adult white rats. The extract marked R was obtained by centrifuging 30% of the homogenate of washed rat livers in a phosphate buffer (0.1 m pH 7.5) in a cooled laboratory centrifuge at 5000 g. Particles difficult to centrifuge were easily separated by the procedure quoted in one of our previous papers[5] after the addition of $^1/_3$ of the total volume of a rivanol (2-etoxy-6, 9-diaminoacridin lactate) solution. After centrifugation, the rivanol present in the supernatant was separated by absorption on active coal (Norit SX 30). The second extract analyzed, marked D, was obtained by centrifuging the 30% homogenate of washed rat livers with saline; particles difficult to centrifuge were precipitated with the help of dextran-sulphate in the presence of calcium chloride. The method was analogous to that used for the isolation of serum lipoproteins according to BURSTEIN[6]. Both extracts were dialyzed and lyophilized. All the work was performed at a temperature of 0–3°C.

The antisera used were obtained by immunizing 4 groups of rabbits for 5 weeks (each group consisting of 3–4 rabbits) with the following antigens: rat serum, 10% homogenate of washed rat livers in saline, extracts R and D (the solution of both extracts contained about 7% proteins).

The results of the immunoelectrophoretic analysis of the serum are given in the diagrams 1–4 (Fig.). On using specific antisera, we succeeded in detecting up to 17 precipitation lines. These lines were numbered with Arabic and Roman numerals. Arabic numerals were used



[1] P. GRABAR and C. A. WILLIAMS, Biochim. biophys. Acta *17*, 67 (1955).

[2] R. SMETANA and E. PALUSKA, Physiologia bohemoslovenica, in press (1961).

[3] O. OUCHTERLONY, Sixth Internat. Congr. Microbiol. *1*, 546 (1954).

[4] J. KOŘÍNEK and E. PALUSKA, Z. Immunitätsforsch. *115*, 92 (1958).

[5] R. SMETANA and J. KOŘÍNEK, Čs gastroenterologie a výživa *10*, 208 (1956).

[6] M. BURSTEIN and J. SAMAILLE, J. Physiol. *49*, 83 (1957).

for those lines, which could also be detected by antiserum against the liver homogenate. Among these lines are those of the γ-globulin, marked 1 and 1′, two of the β-globulin marked 2 and 3 (line 3 is saddle-shaped, forming a continuation of the line of proteins with more rapid mobility), line 4 and 5 belongs to the α_2-globulin fraction and line 7 and 8 to the albumin fraction. Finally, line numbered 9, which is visible before the line of albumin, can be stained by dyes used for the detection of lipoproteins.

In another experiment the results of which are shown in diagram 5, 6, 7 (and 11, 12, 13) of the Figure, we gave the results of the detection of serum proteins (of proteins of extract R) obtained with a specific antiserum No. 2425 (antiserum No. 428) and with the same antiserum after 24 h incubation with a sufficient amount of proteins of extract R (of rat serum) at laboratory temperature. It can be seen from the diagrams 5, 6, and 7, that extract R contains proteins capable by immunochemical reaction of inactivating antibodies of the specific antiserum against serum proteins, which produce the precipitation lines marked by numbers 1, 1′, 2, 4, 5, 6, and 7. It can be seen from the diagrams 11, 12, and 13, that the serum also contains proteins, capable by immunochemical reaction of inactivating antibodies of the specific antiserum against proteins of the liver extract R, which can produce the precipitation lines marked by letters b, d, e, f, h, i, and j.

In order to prove identity between the single serum protein components and those liver proteins, which under the conditions of electrophoresis in Agar gave the same electrophoretic mobility, we used OUCHTERLONY's double diffusion method combined with transferring agar discs with the isolated fractions. Using these methods we succeeded in demonstrating the identity between the serum protein, forming line marked by number 2 and the protein of extract R, forming line marked by b.

In experiments to separate the proteins of liver extracts by means of electrophoresis in agar gel, 8–10 protein fractions could be detected. This is in keeping with our previous findings[5,7]. However, protein fractions of liver extracts with electrophoretic mobility of serum γ-globulin, or lower mobility, could not be demonstrated by the immunochemical reaction, although these proteins were present in both extracts and were well separated by electrophoresis in Agar. It should be considered that some liver proteins have antigenic groups, determining their immunochemical reaction, identical with some serum proteins. They may differ, however, in their physicochemical characteristics, such as electrophoretic mobility, diffusion rate, stability of their protein structure etc.

Diagram	Antigen	Rabbit antiserum
1	S	anti S (No. 137, 138, 177, 2425)
2	S	anti H (No. 1683, 1688, 1695, 2075)
3	S	anti D (No. 2040, 2908)
4	S	anti R (No. 428, 429)
5	S	anti S No. 2425 + saline aa, incubated for 24 h at 20°C
6	S	anti S No. 2425 + 7% solution of R $\overline{aa}$, incubated for 24 h at 20°C
7	Difference of diagram 5 and 6	
8	D	anti S (No. 137, 138, 177, 2425)
9	D	anti H (No. 1683, 1688, 1695, 2075)
10	R	anti S (No. 137, 138, 177, 2425)
11	R	anti R No. 428 + saline $\overline{aa}$, incubated for 24 h at 20°C
12	R	anti R No. 428 + serum aa, incubated for 24 h at 20°C
13	Difference of diagram 11 and 12	

Diagram 1–4, 8–10 illustrate the greatest number of antigens detected by an ideal mixture of the antisera, indicated by our numbers. (S = rat serum, D = protein extract D, R = protein extract R, H = proteins of liver homogenate)

Zusammenfassung. Blutserum-Eiweisse der Ratte und aus Rattenleber isolierte Proteine wurden immunoelektrophoretisch und mit Ouchterlonys Doppeldiffusion untersucht bzw. verglichen. Die Ergebnisse sprechen für Ähnlichkeit oder Identität diverser Serum- und Lebereiweisse.

R. SMETANA and E. PALUSKA

Central Biochemical Laboratory, Charles University Hospital, Prague, and Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague (Czechoslovakia), November 18, 1960.

[7] R. SMETANA and J. KOŘÍNEK, Coll. Czech. Chem. Commun. *23*, 339 (1958).

What Constitutes 'Apparato Reticolare Interno' of Golgi in the Goblet Cells of Vertebrate Intestine?

CAJAL[1], NASSONOV[2], BOWEN[3], DUTHIE[4], CHODNIK[5], and YOKOCHI[6] are a few of many workers who have described the 'apparato reticolare interno' of Golgi in the supranuclear – or secretogenous – or Golgizones of the vertebrate intestinal goblet cells, and have also attributed a vital rôle to it in mucus synthesis. The findings of these earlier cytologists, concerning the existence and the rôle of the 'Golgi apparatus' in these cells, need reinvestigation, especially in the light of the recent illuminating and thought-provoking communications of NATH[7] and BAKER[8], both of whom have categorically denied its very existence from all the vertebrate cells.

The author has carried out, in detail, cytological studies on the intestinal goblet cells of the fish (*Mystus seenghala*), the frog (*Rana tigrina*), the lizard (*Hemidactylus* sp.), and the house- and white rat, with special attention to the problem of the 'Golgi apparatus', by employing, in addition to rational morphological and various current histochemical techniques, old classical 'Golgi techniques' (AOYAMA and KOLATCHEV) and also their various modifications[9,10]. The author has not consistently observed anything in these cells, which could even remotely be compared with the 'basket-like'- or 'reticular Golgi apparatus', reported to have been observed by earlier workers[1–6]. Instead, in the 'Golgi zones' are observed aggregations of either filamentous mitochondria (early recovery and late discharge phases) or distinct lipid bodies (late recovery

[1] R. CAJAL, Trab. del. Lab. Inv. Madrid, Vol. 12 (1914).
[2] N. NASSONOV, Arch. mikr. Anat. *97*, 136 (1923).
[3] R. H. BOWEN, Quart. Rev. Biol. *4*, 484 (1929).
[4] E. S. DUTHIE, Proc. Roy. Soc. Ser. B *113*, 459 (1933).
[5] K. S. CHODNIK, Quart. J. micr. Sci. *88*, 419 (1947).
[6] C. YOKOCHI, Arch. histol. Japan *3*, 37 (1951).
[7] V. NATH, Nature *180*, 967 (1957).
[8] J. R. BAKER, Sym. Soc. exp. Biol. *10*, 1 (1957).
[9] J. R. BAKER, Quart. J. micr. Sci. *85*, 1 (1944).
[10] T. A. MOUSSA, *Microtomists' Vade-Mecum* (Churchill Ltd., London 1949).

phases) or of both or of maturing secretion globules (secretory phases). These cytoplasmic organelles sometimes give rise to the structures which can simply be homologized with the 'Golgi apparatus' of earlier workers[1–6]. To the best of author's knowledge no one has so far specifically denied the existence of the 'Golgi apparatus' in the vertebrate intestinal goblet cells.

It is intended to find out whether the reasons already put forward by the leading antagonists[7,8,11–14] for the appearances of such deceptive 'Golgi reticula' in a variety of other animal cells from time to time, and also put forth by the author himself[15] in the exocrine cells of pancreas, hold good in case of the cells under discussion and also whether there is any extra reason hitherto not described.

It appears that, in the vertebrate intestinal goblet cells, 'Golgi apparatus' may be formed due to the following causes:

1. The preliminary fixatives used in the classical methods cause adherence of the already aggregated lipid bodies (especially in the Golgi zone) and so the over impregnation is facilitated.

2. 'Golgi networks' may be formed simply by the indiscriminate deposition of silver and osmium between crowded secretion globules (mucus droplets).

3. The chemicals used in the various classical methods (e.g. cadmium chloride, chromic acid etc.) are protein precipitents and hence these disrupt the lipid bodies (which in these cells are lipoproteinous histochemically) which serve as segregating membranes for the mucus–which also have proteinous moiety[16]. These disrupted and closely apposed lipid sheaths are then heavily impregnated and give the appearance of typical 'Golgi reticula' in these preparations.

4. Filamentous mitochondria, particularly of rats, are appreciably impregnated by osmium and silver. When such heavily impregnated mitochondrial filaments along with still more heavily impregnated and disrupted lipid bodies (*vide supra*) aggregate in large number in the 'Golgi zone', particularly in recovery phases, these lose their individual identity and give the appearance of typical 'Golgi apparatus', constituting of haphazardly dispersed tortuous solid strands.

In addition, there has been observed, after employing various histochemical techniques[17–19], an intense PNA (not RNA; see KANWAR[20]) concentration in the 'Golgi'- and basalzones of the goblet cells. These PNA-rich areas take up intense blue diffuse haematoxylin (particularly in case of the fish) stain (sufficient to obliterate other finer cellular details) in preparations which do not at any stage involve $K_2Cr_2O_7$ treatment ($K_2Cr_2O_7$ dissolves PNA). These PNA-rich areas, which have sufficient diffuse lipids, also reveal intense metallic impregnation in various 'Golgi preparations'. Since the mucus droplets are neither impregnated nor stained with haematoxylin, these appear as hyaline spaces intermingled with intensely stained or heavily impregnated scanty cytoplasmic strands. All this gives the appearance of a typical 'basket-like Golgi apparatus' of BOWEN[3].

More or less similar explanation, holding basophil cytoplasmic strands responsible for such deceptive appearances, has recently been put forward by MALHOTRA[21] who worked on the vertebrate neurones.

The above observations, denying the very existence of the 'Golgi apparatus', are fully supported by TAYLOR[22], who studied the mammalian intestinal goblet cells under electron microscope.

Résumé. L'auteur montre que l'appareil réticulaire classique de Golgi dans les cellules caliciformes intestinales des Vertébrés est un produit artificiel. Diverses raisons sont alléguées pour expliquer ce fait.

K. C. KANWAR

Department of Zoology, Panjab University, Chandigarh (Punjab, India), January 11, 1961.

[11] W. P. COVELL and G. H. SCOTT, Anat. Rec. *38*, 377 (1928).
[12] O. L. THOMAS, Quart. J. micr. Sci. *89*, 333 (1948).
[13] A. J. CAIN, Quart. J. micr. Sci. *89*, 421 (1948).
[14] J. R. BAKER, Nature *172*, 617 (1953).
[15] K. C. KANWAR, Exper. *14*, 403 (1958).
[16] K. C. KANWAR, Exper. *16*, 355 (1960).
[17] B. M. JORDAN and J. R. BAKER, Quart. J. micr. Sci. *96*, 177 (1955).
[18] R. O. ERICKSON, K. O. SAX, and M. OGUR, Science 110, 472 (1949).
[19] W. C. SCHNEIDER, J. biol. Chem. *161*, 293 (1945).
[20] K. C. KANWAR, Microscope *12*, 245 (1960).
[21] S. K. MALHOTRA, Quart. J. micr. Sci. *100*, 339 (1960).
[22] J. J. TAYLOR, Anat. Rec. *133*, 434 (1959).

Pure Males and Females from Hermaphroditic Strains of *Ophryotrocha puerilis*

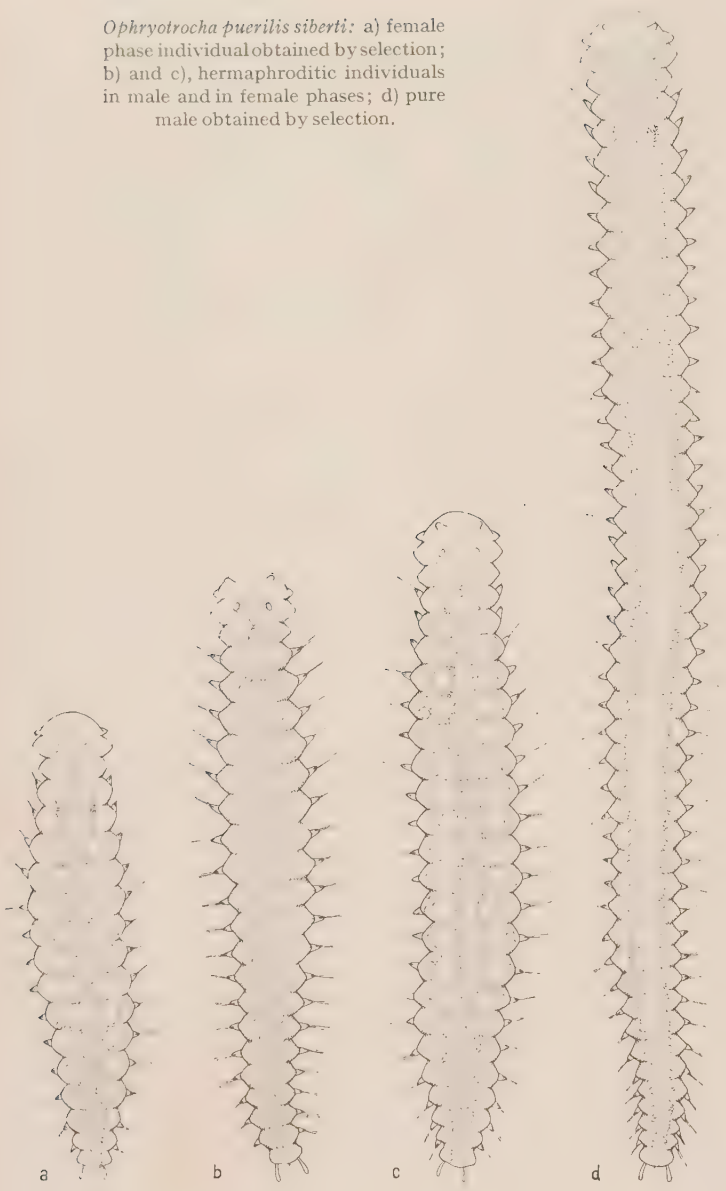
Ophryotrocha puerilis is a proterandrous hermaphroditic Polychete worm[1]. HARTMANN et al.[2] showed that reversal from female to male phase can be obtained in this species by means of various environmental factors, and BACCI[3] demonstrated that the action of such factors has different expression in the Mediterranean and Atlantic subspecies which are named *O. puerilis puerilis* and *O. puerilis siberti* respectively[4].

Selection experiments both for the prolongation of the male and for the anticipation of the female phase[5] were positive in both directions and the minus selection produced at generation some 4 individuals that showed oocytes at a length of 11 or 12 chaetigerous segments, which practically did not undergo a male phase. The plus selection produced (also at generation 4) individuals that reached the length of 25 or 26 segments and died without showing any oocyte during the whole life. Such experiments thus demonstrated the existence of multiple sex genotypes in *Ophryotrocha puerilis*.

Experiments on sex determining mechanisms were resumed in 1959 on a strain of *O. puerilis siberti* from ROSCOFF[6] and they gave results exactly comparable to those obtained in classic research work on polygenes.

The prosecution of selection experiments in the ROSCOFF strain has at present led to the production of pure males in generation 5: two individuals have reached the length of 42 chaetigerous segments (which is the maximum length so far observed in *Ophryotrocha puerilis*) always remaining in the male phase (Fig. d). One of them has been employed in a cross with a female phase individual of 13 segments and the other has been kept isolated and it is now showing clear signs of senility. About 100 individuals of the generation 5 to which the two pure males

[1] E. KORSCHELT, Z. wiss. Zool. *57*, 224 (1893).
[2] M. HARTMANN et al., Zool. Jb. *56*, 389 (1936); *58*, 551 (1938); *60*,1 (1940).
[3] G. BACCI, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. *28*, 1293 (1955).
[4] G. BACCI and M. LA GRECA, Nature Lond. *171*, 1115 (1953).
[5] G. BACCI, Pubbl. Staz. Zool. Napoli *26*, 110 (1955).
[6] G. BACCI and O. BORTESI, Rend. Acc. Naz. Lincei *28*, 92 (1960).



Ophryotrocha puerilis siberti: a) female phase individual obtained by selection; b) and c), hermaphroditic individuals in male and in female phases; d) pure male obtained by selection.

belong have already shown oocytes at a mean length of 23 segments. This mean will reach a higher value when other male phase individuals have passed to the female phase. It must also be pointed out that, although oocytes appear rather early in some of the individuals of the group, they are very scarce as compared with the oocytes developing in female phase individuals that have not been selected for the prolongation of the male phase.

Individuals that change to the female phase at 13 segments have appeared (Fig. a) in a group of 52 individuals that begins to show oocytes at a mean length of 16 segments. Although they cannot be considered as pure females, they undergo a male phase of very short duration.

It can therefore be concluded that selection of multiple sex genotypes has certainly produced pure females in a strain of the Mediterranean subspecies[5] and it has originated females with an extremely reduced male phase in the present experiments. Pure males have now been produced and males that died at 26 segments in previous experiments were also probably pure males carrying some deleterious mutants, as already pointed out[5].

The progressive reduction of female or of male phase at each generation, until male or female individuals appear, demonstrated the possibility of evolution of predominantly male or female strains (in short of monogenic strains) from hermaphroditic strains showing polygenic sex determination. The problem of the relative duration of sex phases in hermaphrodites is thus converted into a problem of sex ratios, which was already explained by a similar genetic mechanism[7]. Developmental patterns peculiar to each species decide whether polyfactorial (or polygenic) sex determination will give rise to unbalanced hermaphrodites[8] or to gonochoric species showing peculiar sex ratios.

Riassunto. La selezione di genotipi sessuali multipli in ceppi originariamente ermafroditi di *Ophryotrocha puerilis* conduce alla produzione di maschi e di femmine pure. La determinazione polifattoriale del sesso può pertanto modificare sia la durata relativa delle fasi sessuali che il rapporto sessi. Ermafroditi non bilanciati e specie monogeniche sono ugualmente originate da un meccanismo di poligametia sessuale.

G. Bacci and O. Bortesi

Istituto di Zoologia dell'Università di Modena (Italy), January 16, 1961.

[7] K. Kosswig, Rev. Fac. Sci. Univ. Istambul *4*, 1 (1939).
[8] G. Bacci, Arch. Zool. Ital. *34*, 49 (1949).

Xanthindehydrogenase in Organen von *Drosophila melanogaster*[1]

Nicht-autonome Erbmerkmale sind der phänogenetischen Analyse besonders leicht zugänglich. Denn hier können durch extrazelluläre Einflüsse die Merkmalsbildungen beeinflusst und eventuell auch Folgen von Erbschäden überwunden werden. Daraus sind Einblicke in die Genwirkung zu erwarten.

Unter den *Drosophila*-Mutanten, die den Pterinstoffwechsel beeinflussen, erwiesen sich *rosy* (*ry*[2,3]), *maroon-like* (*ma-l*[4]), *bronzy* (*bz*[4]) und *sepiaoid* (*sed*[5]) im Transplantationsexperiment als nicht-autonom. Die vier Mutanten sind chemotypisch insofern sehr ähnlich, als sie nur geringe Mengen von Drosopterinen und kein (*ry*, *ma-l*, *bz*) bzw. wenig (*sed*) Isoxanthopterin bilden. Der völlige Mangel von Isoxanthopterin bei *ry*, *ma-l* und *bz* beruht auf dem Fehlen von Xanthindehydrogenase-Aktivität[6–8]. Implan-

[1] Ausgeführt mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.
[2] E. Hadorn und G. E. Graf, Zool. Anz. *160*, 231 (1958).
[3] E. Hadorn und I. Schwinck, Z. Vererbungslehre *87*, 528 (1956).
[4] H. Ursprung, im Druck.
[5] E. Goldschmidt und E. Hadorn, J. Embryol. exp. Morphol. *7*, 316 (1959).
[6] H.-S. Forrest, E. Glassman und H. K. Mitchell, Science *124*, 725 (1956).
[7] E. Glassman und H. K. Mitchell, Genetics *44*, 153 (1959).
[8] E. Glassman, Science *131*, 1810 (1960).

tation von larvalem Fettkörper, Malpighischen Gefässen bzw. Augenanlagen des Wildtyps normalisiert den Drosopteringehalt der *ry*-Wirte[3]; zudem wird in den Wirtshoden Isoxanthopterin gefunden. Das Ausmass dieser Normalisierung ist abhängig von der Menge des implantierten Wildtypgewebes[2] und damit der Menge eines unbekannten «*rosy*$^+$-Stoffes»[3]. Als «*ry*$^+$-Stoff» kommt Isoxanthopterin selbst kaum in Frage, da Injektion von Isoxanthopterin in *ry*[9] bzw. *ma-l*[10] den Isoxanthopteringehalt der Wirtsaugen nicht beeinflusst. Der «*ry*$^+$-Stoff» könnte eher das Enzym Xanthindehydrogenase sein[2]. Zur Prüfung dieser Hypothese wird in der vorliegenden Arbeit die Enzymaktivität in den transplantierten Organen bestimmt. Eine ähnliche Untersuchung wurde unlängst[10] mit etwas anderen Methoden durchgeführt.

Wir verwendeten im wesentlichen die von Glassman und Mitchell[7] angegebene Methode. Die Organe (Wildstamm *Sevelen*) wurden in Insekten-Ringer[11] freipräpariert und in 0,3 ml eiskalter Sigma-Tris-Pufferlösung von pH 8,00 homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 5–10 mg Carbo adsorbens (Siegfried) versetzt und 15 min bis 1 h bei 0° stehengelassen, dann 20 min bei 0° mit 6000 g zentrifugiert. Zur Kontrolle der Adsorption der fluoreszierenden Stoffe an die Kohle wurde 0,1 ml vom Überstehenden auf Chromatographiepapier aufgetragen. Der Rest wurde mit je 0,02 ml 2-Amino-6-oxypteridin ($10^{-3}M$) und Methylenblau ($10^{-3}M$) bei 25°C während 4–5 h inkubiert. Vom Reaktionsgemisch wurden sodann 0,1 ml auf Chromatographiepapier aufgetragen. Chromatographie in Propanol : 1% Ammoniak (2:1) aufsteigend. Die Messung des entstandenen Isoxanthopterins erfolgte direkt vom Papier[12].

Bei einer ersten vergleichsmässigen Untersuchung fanden wir in den Organen von 30 verpuppungsreifen Larven folgende Enzymaktivitäten (ausgedrückt in willkürlichen Fluoreszenzeinheiten des entstandenen Isoxanthopterins, in eckigen Klammern): Hoden [0], Malpighische Gefässe [15], Darm [24], Fettkörper [44], Rest [90], Seziertropfen mit Hämolymphe und Fettzellen [44]. In der Folge beschränkten wir die Untersuchung auf Hoden, Malpighische Gefässe und Fettkörper. Die *Hoden* von 75 verpuppungsreifen Larven zeigten eine geringe [7] Aktivität. Nun haften aber den Hoden dieses Stadiums immer einzelne Fettzellen an, die ohne Beschädigung des Hodens nicht entfernt werden können. Wir prüften deshalb eine Probe von Fettzellen, die annähernd der an 150 Hoden haftenden Fettmenge entspricht, und fanden darin fast gleiche Aktivität [5]. Das Enzym ist also höchstwahrscheinlich in larvalen Hoden nicht vorhanden. In den Hoden von 40 2tägigen Imagines fanden wir zunächst eine ansehnliche Enzymaktivität [13]. Nun wurden aber in einer weiteren Untersuchung solche Hoden mehrmals in Pufferlösung ausgewaschen; am Schlusse wurden dann sowohl die Hoden als auch die Waschflüssigkeit auf Enzymaktivität geprüft. Dabei zeigte sich, dass in den Imaginal-Hoden selbst nur eine sehr geringe Restaktivität vorhanden ist [9], [1,5], deren Signifikanz gegenüber dem Nullniveau mit unseren Methoden kaum geprüft werden kann. In den *Malpighischen Gefässen* von 40 verpuppungsreifen Larven fanden wir in drei Versuchen Aktivitäten von [65], [46], [44] Einheiten. Die Aktivität imaginaler Malpighischer Gefässe scheint etwas geringer zu sein [22]. Sie nimmt bei mehrmaligem Auswaschen auf [11] ab. Die entsprechende Waschflüssigkeit weist indessen keine Aktivität mehr auf, so dass die [11] Einheiten höchstwahrscheinlich auf die Malpighischen Gefässe selbst zurückzuführen sind. Beträchtlich höhere Aktivität wurde gefunden im *larvalen Fettkörper*. Schon das Fett von 5 verpuppungsreifen Larven ergibt Isoxanthopterinmengen von [50]–[115] Einheiten (2 Versuche); dabei ist in der jeweiligen Waschflüssigkeit keine Spur von Aktivität mehr festzustellen.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass larvale und imaginale Hoden kaum, Malpighische Gefässe höchstwahrscheinlich und larvaler Fettkörper sicher als Lieferanten von Xanthindehydrogenase in Betracht kommen. Wir müssen auch bedenken, dass in der Transplantationspraxis die verwendeten Organe nicht sorgfältig gewaschen werden; die eingeführte Aktivität wird also eher höher sein, als von den neuen Ergebnissen zu erwarten wäre. Zudem bleiben die transplantierten Organe ja im Wirtsorganismus am Leben. Die «Inkubation» erfolgt im Nicht-Autonomie-Experiment also während mehrerer Tage, so dass die geringe Menge eingeführten Enzyms ausreichen dürfte zur Bildung der – ebenfalls geringen – Menge Isoxanthopterin im mutierten Wirt. Von diesem Standpunkt aus könnte somit Xanthindehydrogenase durchaus identisch sein mit «*ry*$^+$-Stoffen». Das Enzym würde durch Fettkörper und Malpighische Gefässe des Wildtyps in die Mutante eingeführt und die dort akkumulierte Vorstufe 2-Amino-6-oxypteridin in Isoxanthopterin umwandeln. Das dabei freiwerdende DPNH (= «*ry*$^+$-Stoff» nach Hubby und Forrest[10]) könnte vielleicht die vermehrte Drosopterinsynthese ermöglichen, wie es die beiden Autoren vorgeschlagen haben. Zwar führte Injektion von DPNH in verpuppungsreife Larven von *ma-l* nicht zu einer Erhöhung des Drosopteringehaltes (unveröffentlicht); diese Beobachtung ist jedoch nicht schlüssig, da die Drosopterinsynthese erst etwa 70 h[13] nach der Injektion beginnt. Die Annahme, dass die Xanthindehydrogenase mit dem postulierten «*ry*$^+$-Stoff» identisch ist, würde auch sehr gut das geschlechtsspezifisch-nicht-autonome Auftreten von Isoxanthopterin in transplantierten Hoden[14] erklären, die nach unseren neuen Befunden das Enzym ja selbst nicht enthalten. Dasselbe dürfte für den geschlechtsspezifischen Unterschied im Isoxanthopteringehalt von Augentransplantaten[13] gelten. Man müsste annehmen, dass die über eine massgebende Entwicklungsphase verteilte und akkumulierte totale Enzymaktivität im Männchen grösser sei als im Weibchen. Entsprechende Untersuchungen sind im Gange.

Summary. High activity of the enzyme, xanthindehydrogenase, was detected in larval fat-body of wild type *Drosophila melanogaster*. The Malpighian tubules of both larvae and adults exhibit activity, too, though rather little. No activity was detected in larval testes, while probably insignificant traces were found in adult testes. The results are discussed with regard to non-autonomy of mutants deficient in the enzyme.

H. Ursprung[15] und E. Hadorn

Zoologisch-vergleichend anatomisches Institut der Universität Zürich (Schweiz), 30. Januar 1961.

[9] G. E. Graf, E. Hadorn und H. Ursprung, J. Ins. Physiol. *3*, 120 (1959).
[10] J. L. Hubby und H.-S. Forrest, Genetics *45*, 211 (1960).
[11] B. Ephrussi und G. W. Beadle, Amer. Naturalist *70*, 218 (1936).
[12] E. Hadorn und A. Kühn, Z. Naturforschung *8b*, 582 (1953).
[13] E. Hadorn und I. Ziegler-Günder, Z. Vererbungslehre *89*, 221 (1958).
[14] E. Hadorn, G. E. Graf und H. Ursprung, Rev. Suisse Zool. *65*, 335 (1958).
[15] Gegenwärtige Adresse: Mergenthaler Laboratory for Biology, The Johns Hopkins University, Baltimore (Maryland).

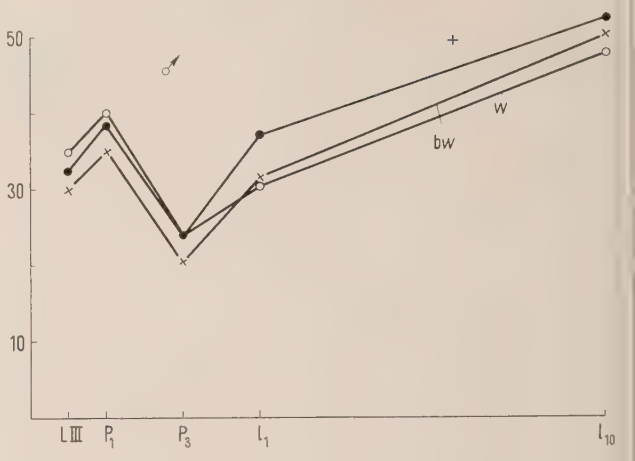
Xanthindehydrogenase beim Wildtyp und bei den Mutanten *white* and *brown* von *Drosophila melanogaster*[1]

Die Augenfarbmutanten *white* (*w*; 1–1,5) und *brown* (*bw*; 2-104,5) akkumulieren wie der Wildtyp während der Metamorphose Isoxanthopterin und Harnsäure. Beim Wildtyp werden die erreichten Konzentrationen dieser Verbindungen im Körper dauernd beibehalten, während sie bei *w* und *bw* rasch abnehmen und 4 d nach dem Schlüpfen im Körper nicht mehr nachzuweisen sind[2–6]. Das Fehlen von Harnsäure und Isoxanthopterin in älteren Imagines könnte darauf beruhen, dass das Enzym Xanthindehydrogenase nicht oder in einer inaktiven Form vorhanden ist. Dieses Ferment katalysiert die Oxydation von 2-Amino-6-oxypteridin zu Isoxanthopterin bzw. Hypoxanthin zu Xanthin und Harnsäure[7].

In der vorliegenden Arbeit bestimmten wir die Aktivität dieses Enzyms im Laufe der Entwicklung, wobei wir im wesentlichen die von GLASSMAN und MITCHELL[8] angegebene Methode verwendeten. 40 mg gleichaltrige, auf Standardfutter aufgezogene Drosophila-Männchen (verpuppungsreife Larven (L III), 1 d bzw. 3 d alte Puppen (P_1 und P_3), 1 d bzw. 10 d alte Imagines (I_1 und I_{10})) des Wildstammes *Sevelen* bzw. der Mutanten *white* und *brown* wurden in einem kleinen Glas-Homogenisator in 1 ml eiskaltem Sigma-Tris-Puffer (pH 8,00) homogenisiert und mit 40 mg pulverisierter Kohle (Carbo adsorbens Siegfried) versetzt. Nach 30 min Stehen bei 1°C wurde während 20 min mit 20000 g bei 1°C zentrifugiert. Alle fluoreszierenden Stoffe sind jetzt quantitativ an die Kohle adsorbiert, was durch Chromatographie eines Teiles des Überstehenden kontrolliert wurde. 0,5 ml des Überstehenden wurden sodann mit 0,02 ml 10^{-3} *M* 2-Amino-6-oxypteridin und 0,02 ml 10^{-3} *M* Methylenblau 20 min lang bei 25°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion durch Eintauchen in siedendes Wasser gestoppt. Vom Reaktionsgemisch wurden 0,05 ml auf Chromatographiepapier Whatman Nr. 1 aufgetragen und aufsteigend eindimensional chromatographiert (*n*-Propanol:1% Ammoniak 2:1). Als Mass für die Enzymaktivität verwendeten wir die Menge des entstandenen Isoxanthopterins, dessen Fluoreszenzintensität direkt vom Papier gemessen wurde[9].

Die Ergebnisse gehen aus der Figur hervor, deren Punkte Mittelwerte aus je zwei Ansätzen darstellen. Auffällig ist zunächst, dass offenbar keine wesentlichen Unterschiede in der Aktivität der Extrakte verschiedener Genotypen bestehen. Allen untersuchten Genotypen ist sodann gemeinsam der Anstieg beim Metamorphosebeginn, der pupale Abfall der Aktivität und der anschliessende Anstieg während des Imaginal-Lebens.

Nach diesen *in vitro* erhobenen Befunden haben also die Mutanten *w* und *bw* zeitlebens die Fähigkeit, 2-Amino-6-oxypteridin in Isoxanthopterin umzuwandeln. Diese Annahme konnte bestätigt werden durch folgenden *in vivo*-Versuch: 0,5 µl einer $5 \cdot 10^{-2}$ *M* Lösung von 2-Amino-6-oxypteridin in Wasser wurden in 6 d alte *white*-Fliegen injiziert. Die Fliegen wurden anschliessend in den 25°C-Thermostaten zurückgebracht und nach 6 bzw. 12 h *in toto* zusammen mit einem kleinen Tropfen (1–2 µl) Lösungsmittel auf Chromatographiepapier zerrieben. Diese Methode hat gegenüber dem üblichen «trockenen» Auftragen der Fliegen den Vorteil, dass die Fraktionen weniger am Startpunkt liegen bleiben. Zur Kontrolle wurden unbehandelte *white*-Fliegen des gleichen Alters mitchromatographiert. Diese Fliegen enthalten erwartungsgemäss[3] keine fluoreszierenden Stoffe, während in den injizierten Tieren Isoxanthopterin in beträchtlichen



Mengen (erheblich mehr, als der Wildtyp normalerweise enthält) gebildet worden ist, und zwar schon nach 6 h «Inkubation» bei Männchen und Weibchen. (Einige für die Chromatographie nicht verwendete injizierte Fliegen starben nach rund 12 h; der Grund dieses Absterbens wurde nicht untersucht.)

Für das Fehlen von Isoxanthopterin und Harnsäure in *w*- und *bw*-Imagines kann somit kaum ein Fehlen von Enzym-Aktivität verantwortlich gemacht werden. Unsere Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen neuerer Untersuchungen unseres Institutes[4], in denen u. a. durch Fütterungsversuche gezeigt werden konnte, dass 10 d alte *w*- und *bw*-Imagines imstande sind, Isoxanthopterin und Harnsäure zu synthetisieren. Die beiden Verbindungen werden fortwährend mit den Spätexkreten wieder ausgeschieden[4]. Merkwürdigerweise scheiden aber sowohl *w* als auch *bw* nicht mehr Isoxanthopterin und Harnsäure aus als der Wildtyp. Dies gilt sowohl für die Meconien[10,11] wie auch für Spätexkrete[4]. Der Grund, weshalb adulte *w*- und *bw*-Tiere trotzdem keine Harnsäure enthalten, scheint darauf zu beruhen, dass die Uricase-Aktivität in *w* und *bw* grösser ist als beim Wildtyp; die gebildete Harnsäure wird demnach dauernd abgebaut, oder nicht abgebaute Restmengen können auch sofort ausgeschieden werden. Für das Fehlen von Isoxanthopterin in *w*- und *bw*-Imagines scheint der niedrige Gehalt an der Vorstufe 2-Amino-6-oxypteridin verantwortlich zu sein. Diese Verbindung wird in den Meconien von *w* in grösseren Mengen ausgeschieden als beim Wildtyp[10,11]. Diesem Befund entspricht auch die Beobachtung von HADORN und MITCHELL[2], wonach *w*-Abdomina weniger 2-Amino-6-oxypteridin enthalten als der Wildtyp.

[1] Ausgeführt mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung. Herrn Prof. Dr. E. HADORN danke ich herzlich für die Förderung dieser Arbeit.

[2] E. HADORN und H. K. MITCHELL, Proc. Natl. Acad. Sci. USA *37*, 650 (1951).
[3] E. HADORN, Exper. *10*, 483 (1954).
[4] P. AUF DER MAUR, Z. Vererb., im Druck.
[5] R. DANNEEL und B. ESCHRICH-ZIMMERMANN, Z. Naturforsch. *12b*, 730 (1957).
[6] G. E. GRAF, Genetics *44*, 513 (1959).
[7] H. S. FORREST, E. GLASSMAN und H. K. MITCHELL, Science *124*, 725 (1956).
[8] E. GLASSMAN und H. K. MITCHELL, Genetics *44*, 153 (1959).
[9] E. HADORN und A. KÜHN, Z. Naturforsch. *8b*, 582 (1953).
[10] E. HADORN und R. KÜRSTEINER, Archiv Julius Klaus Stiftung *30*, 494 (1955).
[11] R. KÜRSTEINER, Rev. suisse Zool., im Druck.

[12] Gegenwärtige Adresse: Mergenthaler Laboratory for Biology, The Johns Hopkins University, Baltimore (Maryland).

Summary. Mature larvae, one day and three days old pupae, one day and ten days old adult *Drosophila melanogaster* males were assayed *in vitro* for the enzyme, xanthinedehydrogenase. Very high enzyme activity was found in wildtype and both *w* and *bw* throughout the period investigated. Also 6 days old *white* flies proved to be able to form isoxanthopterin from 2-amino-4-oxypteridine in an *in vivo* assay. The results are discussed with regard to the absence of isoxanthopterin and uric acid in *white* and *brown* imagines.

H. Ursprung[1,2]

Zoologisch vergleichend-anatomisches Institut der Universität Zürich (Schweiz), 23. Februar 1961.

Spontaneous Potentials from Explants of Embryo Chick Pons (Myelencephalon) in Culture[1]

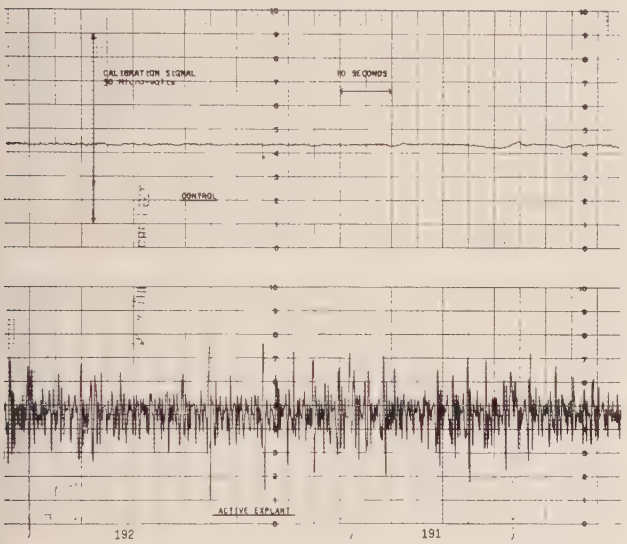


Fig. 1. *Lower Trace:* Record of spontaneous potentials from Pons after 5 h in culture. X axis – Vertical lines 1 sec apart. Y axis – Horizontal lines $1^1/_2$ μV apart. *Upper Trace:* Control of dead cerebellar tissue under identical conditions and with identical time and amplitude scales.

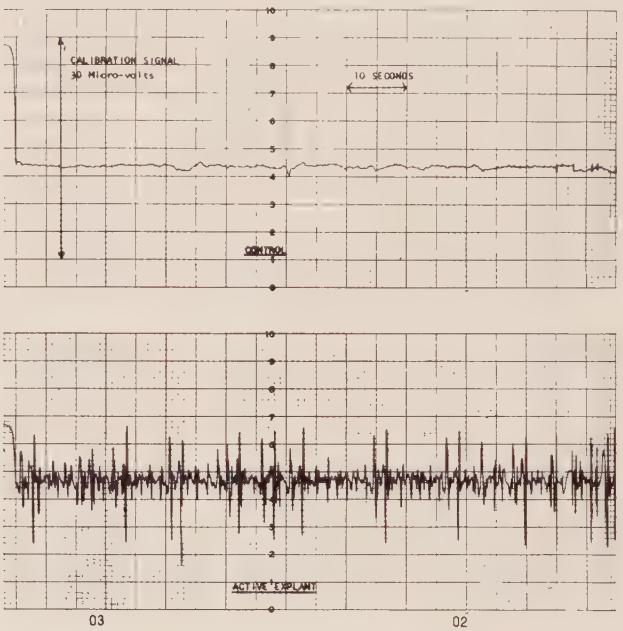


Fig. 2. *Lower Trace:* Record of spontaneous potentials from Pons after 36 h in culture. X axis – Vertical lines 1 sec apart. Y axis – Horizontal lines $1^1/_2$ μV apart. *Upper Trace:* Control of dead cerebellar tissue under identical conditions and with identical time and amplitude scales.

Spontaneous potentials have been demonstrated in explants from the pontine flexure of the myelencephalon at the level of the middle cerebellar peduncles and the 5th, 6th, and 7th cranial nerve nuclei of 11 day chick embryos using techniques and supernatant similar to those used to demonstrate spontaneous potentials from explants of chick embryo cerebellum in tissue culture in Kahn tubes[2]. The explants used in this work were 1 mm thick coronal slices of myelencephalic tissue. The control used was dead cerebellar tissue explanted into a Kahn tube in the same manner as the myelencephalic tissue and kept side by side with the tubes containing the living culture material in the same incubator with identical amplification and recording apparatus. The living myelencephalic tissue gave potentials with the same form and magnitude and the control gave no potentials at all in each recording channel where they were tried.

Figure 1 shows the form of the potentials 5 h after the explantation. They consisted of a complex combination of relatively simple signals against a background of a repetitive signal of about 5 μV coming at intervals of about $1^1/_2$ sec. Larger potentials of a relatively simple form and a magnitude of about 15 μV were superimposed on the repetitive lesser signals with a tendency to occur in pairs of which the individual members were about 2 sec apart. These pairs occurred at about 10 sec intervals.

Figure 2 shows the form of the potentials 36 h after explantation. The small repetitive signal had now disappeared and the larger signals had become less in amplitude—4–5 μV and the tendency to occur in pairs is still present though the members of the pairs are further apart (5–10 sec). The pairs themselves are at intervals of about 20 sec. This activity continued for more than 120 h after explantation.

Zusammenfassung. Vorkommen und Form spontaner Potentialen aus Myencephalon-Explantaten (Nuclei-Region der Kranialnerven 5–7) 11 Tage alter Hühnchenembryonen in Gewebekultur werden beschrieben. Die Registrierung erfolgte während mehr als 120 h.

A. W. B. Cunningham

Tissue Dynamics Laboratory, Pathology Department, University of Texas Medical Branch, Galveston (Texas), January 16, 1961.

[1] This work was done under a U.S. Navy Contract, NONR 1598(04).

[2] A. W. B. Cunningham, M. Dougherty, and B. J. Rylander, Nature *186*, 477 (1960).

Histamine Stimulation of Gastric Pepsin and Hydrochloric Acid in Patients of Vitiligo

SHUKLA and MUKERJI[1] observed that patients of vitiligo secreted subnormal amount of hydrochloric acid in the gastric juice. To find out how they responded to histamine stimulation, fractional gastric analysis was conducted in fifteen normal healthy individuals and thirty patients of vitiligo after subcutaneous injection of 0.01 mg of histamine acid phosphate/kg of body weight. Gastric secretions, aspirated every 5 min by syringe for 2 h, were later made into hourly volumes. In these hourly samples, free acid was found by titration against $N/10$ NaOH using phenolphthalein and Topfer's reagent as indicators, and pepsin was determined by GLICK's[2] modification of ANSON's[3] method using casein as the substrate. Hourly rate of output of free acid and pepsin was calculated from these volumes and concentrations.

The result was recorded in the Table.

The Table shows that both patients and normal subjects secrete 7–10 m.Eq. of hydrochloric acid/h. This amount of hydrochloric acid produces an approximate pH range of 2–3[4]. According to HOLLANDER[5], maximum conversion of pepsinogen to pepsin occurs at a pH range of 2–4.5. Therefore, at 2–3 pH, as observed in the experiment here, a maximum amount of pepsinogen would be changed to pepsin. Under these ideal conditions for formation of pepsin, it is found that patients of vitiligo are secreting two-thirds of the amount of pepsin to that secreted by the normal group.

The reduced value of enzyme in the stomach of patients will affect the hydrolysis of injested protein molecule at the more centrally located peptide linkage of α-carboxyl group of dicarboxylic amino acid and α-amino radical of aromatic amino acid[6]. The enzyme specifically splits this form of the peptide linkage which is present in L-tyrosine and L-phenylalanine residues[7]. Therefore, the deficiency of pepsin will interfere with the release of these amino acids. The action of the enzyme is quantitatively proportionate to the amount of pepsin[8], hence its lack will ultimately lead to a deficiency of amino acids phenylalanine and tyrosine. Phenylalanine is an essential amino acid[9] and along with tyrosine these form the basic substances for synthesis of melanine[10].

Histamine stimulation of gastric pepsin and hydrochloric acid in patients of vitiligo

Clinical category	No. of cases	Hourly output					
		Pepsin (Casein units)			HCl (m. Eq.)		
		Range	Mean	Median	Range	Mean	Median
Normal subjects	15	1920–51520	29039	34320	1.6–20	8.36	7.00
Vitiligo patients	30	1440–38400	21784	23020	0 –15	7.00	6.85

Therefore, it can be postulated that deranged synthesis of melanine in patients on vitiligo is induced by lack of secretion of pepsin. Detailed account of the work will be published elsewhere.

Zusammenfassung. Die stündliche Pepsinsekretion bei dreissig Vitiligo-kranken und 15 gesunden Personen wurde nach Histaminstimulation gemessen. Bei den Vitiligo-Kranken wurden zwei Drittel der normalen Pepsinsekretion beobachtet.

R. C. SHUKLA[11]

Division of Experimental Medicine, Central Drug Research Institute, Lucknow (India), 19th December, 1960.

[1] R. C. SHUKLA and B. MUKERJI, Ind. J. Med. Res. *48*, 714 (1960).
[2] D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis* (Interscience Publishers, N.Y. 1954), Vol. 2, p. 345.
[3] M. L. ANSON, J. gen. Physiol. *22*, 79 (1953).
[4] M. BROADANSKY, *Introduction to Physiological Chemistry* (John Wiley & Sons, N.Y.) IV. Ed., p. 18.
[5] F. HOLLANDER, Amer. J. Med. *13*, 453 (1952).
[6] M. BERGMANN and J. S. FRUTON, J. biol. Chem. *117*, 225 (1940).
[7] J. S. FRUTON and M. BERGMANN, J. biol. Chem. *127*, 627 (1939).
[8] M. BERGMANN and J. S. FRUTON, in *Advances in Enzymology* (Ed. F. F. HARD and C. H. WERKMAN, Interscience Publishers, N.Y. 1941), Vol. 1, p. 63.
[9] M. WOMAC and W. C. ROSE, J. biol. Chem. *107*, 499 (1934).
[10] H. S. RAPER, Biochem. J. *21*, 89 (1927).
[11] Thanks are due to Mr. R. K. SORAUT for his valuable assistance in this work.

The Influence of Reserpine upon the Changes in Femoral Blood Flow Produced by Stimulation of the Lumbar Sympathetic Chain[1]

The depletion of the norepinephrine stores in the heart[2–4] and in artery walls[5,6] is the likeliest explanation for the diminution of the characteristic response of the heart[7–9] and vessels to stimulation of adrenergic nerve fibers observed after pretreatment with reserpine. Recently graded doses of reserpine were found to cause a graded reduction in the effect of sympathetic nerve stimulation on myocardial contractility[9]. As an extension of these findings, the present study was designed to determine the relationship between reserpine dosage and function of the sympathetic nerves supplying the femoral vascular bed of the dog.

Under pentobarbital anesthesia and after 5 mg/kg heparin i.v. a double cannulation was made in the left external iliac artery of 18 dogs (7.1–14.8 kg). Blood from the proximal cannula was led through a Shipley-Wilson rotameter and back into the distal cannula. The perfusion pressure was measured from a sidearm placed just before the distal cannula. A sidearm placed just before the flowmeter was connected to the right external jugular vein so that, in order to lower the perfusion pressure, blood could be shunted away from the leg at will. The lungs were ventilated artificially with air. A thermometer was placed between the toes and the temperature was kept at

[1] This work was supported by grants from the U.S. Public Health Service H-2205, the American Heart Association 59-G-11, and the Eugene Higgins Trust.
[2] A. CARLSSON, E. ROSENGREN, Å. BERTLER, and J. NILSSON, in *Psychotropic Drugs* (Elsevier Publ. Co., Amsterdam 1957), p. 363.
[3] O. KRAYER and M. K. PAASONEN, Acta physiol. scand. *42*, Suppl. 145, 88 (1957).
[4] M. K. PAASONEN and O. KRAYER, J. Pharmacol. *123*, 153 (1958).
[5] J. H. BURN and M. J. RAND, Lancet *273*, 1097 (1957).
[6] J. H. BURN and M. J. RAND, Brit. Med. J. *1958* i, 903.
[7] U. TRENDELENBURG and J. S. GRAVENSTEIN, Science *128*, 901 (1958).
[8] S. HUKOVIC, Brit. J. Pharmacol. *14*, 372 (1959).
[9] J. R. BLINKS and D. R. WAUD, J. Pharmacol. *131*, 205 (1961).

33–35°C by means of an infrared lamp directed on the left thigh. The distal end of the left lumbar sympathetic chain, cut at L5, was placed on two platinum electrodes.

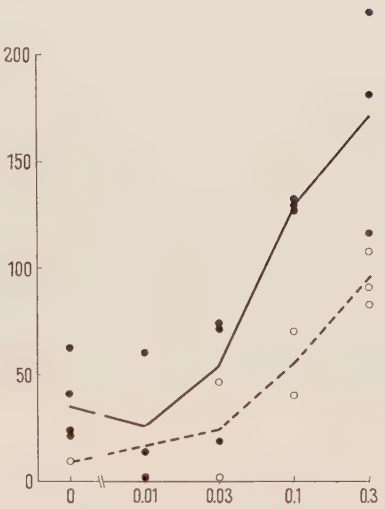
Nerve stimulation (condenser discharges, 20/sec, supramaximal intensity) was applied for 5 sec and maximal change in flow at the initial arterial pressure was measured. Some of the blood flow was then diverted to the jugular vein and another stimulation was effected at the lower perfusion pressure. This procedure was repeated and a series of pressures and corresponding flows were determined, and curves representing the relationship between pressure and flow were plotted. As a measure of the effect of nerve stimulation the change in flow at the perfusion pressure of 80 mm Hg was established by interpolation.

Reserpine (lyophilized reserpine phosphate)[10] was given subcutaneously; all doses refer to the base. In 12 dogs, single doses in the range of 0.01 to 0.3 mg/kg were given 24 h before the experiment; 2 dogs received 10 daily doses of 0.006 mg/kg, the last injection was given 24 h prior to the experiment.

Results. In four normal animals maximal sympathetic stimulation reduced femoral blood flow to 22–63% of the control flow. After a single dose of reserpine, 0.01 mg/kg or 0.03 mg/kg, the response was in the normal range. At 0.1 mg/kg, sympathetic stimulation resulted in an increase rather than a decrease in blood flow, and at 0.3 mg/kg, the increase in flow was very marked (Fig.). In the presence of 1 mg/kg atropine sulfate, increasing doses of reserpine produced graded decreases in the reduction of blood flow so that, after 0.3 mg/kg, maximal sympathetic stimulation altered blood flow only slightly or not at all (see Fig.).

After 10 daily doses of reserpine 0.006 mg/kg (2 preparations), nerve stimulation increased the femoral blood flow to 120% and 170% respectively of the control values. Administration of atropine unmasked a residual constrictor response which reduced blood flow to 60% and 85% respectively of the controls.

Doses of reserpine which are known to reduce the level of norepinephrine in the dog heart[9] also alter the function of the sympathetic fibers innervating the blood vessels of the leg. The single pretreatment dose of 0.1 mg/kg so interferes with vasoconstrictor function in the leg of the dog, that vasoconstriction in response to sympathetic nerve stimulation is overbalanced by vasodilator activity. The same dose of reserpine reduces norepinephrine levels in the heart of the dog to about $^1/_3$ of normal. When this dilator effect, caused by the stimulation of sympathetic cholinergic neurons, is annulled by atropine, a residual vasoconstrictor effect is seen which, however, no longer occurs if the pretreatment dose of reserpine is increased to 0.3 mg/kg. The same dose of reserpine was also required to abolish the effect of sympathetic nerve stimulation on myocardial contractility[9].



Influence of reserpine pretreatment on response of the femoral vascular bed to electrical stimulation of the lumbar sympathetic chain. Sixteen dogs. Pentobarbital anesthesia. Artificial respiration. Heparin 5 mg/kg. Ordinate: blood flow through left femoral artery after stimulation as a percentage of the flow before stimulation of lumbar sympathetic chain at L5, both at a perfusion pressure of 80 mg Hg. Abscissa: dose of reserpine (mg/kg) given 24 h before the experiment. Full circles: without atropine; a solid line joins the means. Open circles: after atropine sulfate 1 mg/kg; a broken line joins the means. For further details see text.

The strong cumulative action of reserpine, emphasized in earlier studies[11,12] is shown by the fact that, in the present experiments, the daily reserpine dose of 0.006 mg/kg given for 10 days is as active as the single dose of 0.1 mg/kg[13].

Zusammenfassung. Die durch sympathische Nervenreizung ausgelöste Vasoconstriktion im Hinterbein des Hundes wird durch Reserpinvorbehandlung aufgehoben. Die dazu benötigten Reserpindosen entsprechen denen, die am Herzen Verlust der Nervenfunktion und des Noradrenalingehaltes hervorrufen.

D. R. Waud

Department of Pharmacology, Harvard Medical School, Boston (Massachusetts), January 9, 1961.

[10] Generously supplied by Ciba Pharmaceutical Products Inc., Summit (New Jersey).

[11] D. R. Waud, S. R. Kottegoda, and O. Krayer, J. Pharmacol. *124*, 340 (1958).

[12] E. Muscholl and M. Vogt, J. Physiol. *141*, 132 (1958).

[13] The author would like to thank Mr. A. Banks for his careful assistance.

Technische Probleme der Hämoglobin-Elektrophorese im Stärkeblock[1]

Die von Kunkel und Wallenius[2] angegebene Stärkeblock-Elektrophorese eignet sich besonders zum Nachweis kleiner Hämoglobin-[3–5] und Myoglobinmengen[6]. Da die im Handel befindlichen Hochspannungs-Elektrophorese-Geräte als Universalapparate ausserordentlich kostspielig sind, haben wir in Zusammenarbeit mit der Firma Therma AG Schwanden (GL Schweiz) einen einfacheren Apparat konstruiert.

Apparatur. Als Kühlelement dient eine 80 × 120 cm messende Kühlplatte Therma aus Metall, wie sie für industrielle und gewerbliche Zwecke serienmässig hergestellt wird. Sie ist mit einer Therma-Kühlmaschine vom Typ LT 2 F 33 mit $^1/_3$ PS Drehstrommotor verbunden und

[1] Die Arbeit wurde mit Hilfe eines Forschungsbeitrages des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

[2] H. G. Kunkel und G. Wallenius, Science *122*, 288 (1955).

[3] K. Betke, Internist *1*, 236 (1960).

[4] K. Betke, P. Schlaich und H. Huidobro-Tech, Klin. Wschr. *37*, 794 (1959).

[5] P. S. Gerald und L. K. Diamond, Blood *13*, 61 (1958).

[6] H. R. Marti, Klin. Wschr. *39*, 286 (1961).

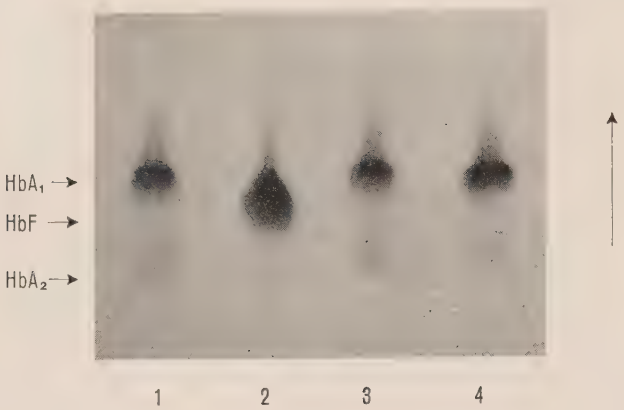


Fig. 1. Trennung der normalen Hb-Fraktionen. Laufzeit 8 h. Von links nach rechts: 1 = Hämolysat mit 3,2% Hb A_2. 2 = Nabelschnur-Hämolysat. 3 = Hämolysat mit 4,4% Hb A_2. 4 = Hämolysat mit 2,3% Hb A_2.

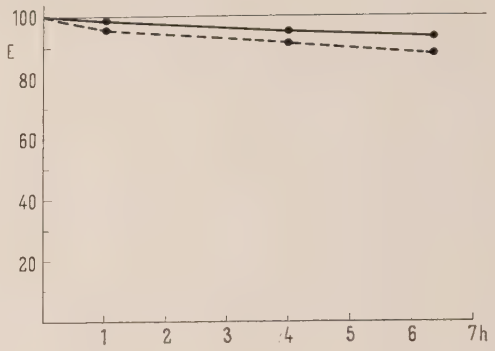


Fig. 2. Unstabilität eluierter Hb-Fraktionen bei Zimmertemperatur. Annähernd linearer Abfall der optischen Dichte. Photometrische Messung bei 415 mμ. Extinktion zu Beginn als 100% gerechnet. —— = Oxy-Hb mit Zusatz von KCN. ----- = Oxy-Hb ohne KCN. (Mittelwerte von 12 Messungen bei 6 eluierten Fraktionen.)

durch ein Regulierventil auf eine Oberflächentemperatur von + 4°C eingestellt. Auf der Kühlfläche liegt eine Glasplatte mit guter Wärmeleitfähigkeit, auf welche ein 2 cm hoher Kunststoffrahmen wasserdicht aufgeschweisst ist. Auf diese Weise entstehen 2 je 36 × 40 cm messende und 2 cm tiefe Kammern für die Stärke. Ein guter und gleichmässiger Wärmeabfluss ist aber nur möglich, wenn Metalloberfläche und Glasplatte durch ein Bindemittel mit hoher Wärmeleitfähigkeit fest miteinander verbunden sind. Diese Verbindung geschieht durch einen von der Firma Therma gelieferten Spezialkitt, der eine fast ebenso hohe Wärmeleitfähigkeit aufweist wie Metall. Damit ist sogar ein besserer Wärmeabfluss gewährleistet als bei der sonst üblichen Kühlung durch Flüssigkeitsgemische[3,4,7].

Auf zwei einander gegenüberliegenden Seiten der Stärkekammern befindet sich in einer Vertiefung von 10 cm je 1 Puffergefäss mit einem Platindraht als Elektrode. Der Rahmen der Kühlplatte ist beidseitig durch einen Kunststoffüberzug isoliert und durch eine eingebaute Heizspirale vor Kondenswasserbildung geschützt. Als Stromquelle dienen 2 handelsübliche Gleichrichter, die eine konstante Spannung von 600 V liefern. Es wird mit einer Stromstärke von 40–60 mA pro Kammer gearbeitet. Schliesslich sind noch alle erforderlichen Sicherungsvorrichtungen angebracht: Einbau in einen Schrank, Erdung und Absicherung der gesamten elektrischen Anlage, ferngesteuerter Motorschütz, rotes Betriebslicht, Sicherungsschalter zum Unterbruch des Stromkreises bei jeder Manipulation.

Arbeitsmethode. Wir verwenden üblicherweise Veronal-Veronal-Na-Puffer pH 8,6, Ionenstärke 0,075. Herstellung des Stärkeblocks und Auftragen der Hämoglobin(Hb)-Proben erfolgen nach der von BETKE[3,4] angegebenen Methode. Auf eine zusätzliche Wiederanfeuchtung des Stärkeblocks durch Pufferspray verzichten wir. Die Stromübertragung von den Pufferschalen auf den Stärkeblock geschieht durch puffergetränkte mehrschichtige Filterpapierbrücken, die zur Vermeidung von Verdunstung mit einer Cellophanfolie bedeckt sind. Etwa 3–4 mm über dem Stärkeblock liegt gemäss dem Vorschlag von GERALD und DIAMOND[5] eine Glasplatte, welche gleichzeitig die Filterpapierbrücken auf die Stärke drückt. Die Elektrophorese läuft über Nacht, und nach einer Laufzeit von 8–14 h ist eine gute Auftrennung erreicht (vgl. Fig. 1).

Die einzelnen Hb-Fraktionen können ohne Schwierigkeit auf einer Glasfritte quantitativ aus der Stärke eluiert werden. Wir arbeiten nach dem Vorschlag von BETKE[3] mit Oxy-Hb und messen die eluierten Fraktionen in der Soretbande bei 415 mμ. Alle verdünnten Hb-Lösungen sind aber unbeständig. Eluieren, Zentrifugieren und Messen am Photometer nehmen für 10–20 Fraktionen mehrere Stunden in Anspruch, und während dieser Zeit sinkt die Extinktion der Hb-Lösungen deutlich ab. Zur Bestimmung dieser Extinktionsabnahme bei Zimmertemperatur haben wir fortlaufende Messungen frisch hergestellter Eluate von Hb A_2 und kleinen Hb A_1-Mengen vorgenommen. Dabei zeigt sich, dass die Extinktion von Oxy-Hb bei 415 mμ innerhalb von 4 h um fast 10% zurückgeht. (12 Messungen bei 6 verschiedenen Eluaten: Mittelwert nach 4 h 90,75% des Ausgangswertes mit Streubereich zwischen 89 und 93%.) Es ist gleichgültig, ob Hb A_1 oder Hb A_2 vorliegt und ob mit *Aqua dest.* oder Phosphatpuffer pH 6,8 eluiert wird. Auch Messungen bei 540 mμ[8] ergeben denselben prozentualen Abfall. Im Parallelversuch wurde zum halben Eluat aller Fraktionen pro 5 ml 1 Tropfen 5% KCN-Lösung gegeben. Der Mittelwert der Extinktion bei 415 mμ beträgt nach 4 h mit KCN 94,5%, ohne KCN 90,75%, und nach $6^1/_2$ h mit KCN 93,3%, ohne KCN 87,8% (Streubereiche nach $6^1/_2$ h 90–96,5% bzw. 85–90%). Daraus folgt, dass sich der auf Unstabilität von Oxy-Hb-Lösungen beruhende Messfehler durch Zusatz von KCN auf etwa die Hälfte reduzieren lässt (vgl. Fig. 2).

Auch wenn das Hämolysat vor der Elektrophorese mit kleinen Mengen KCN versetzt wurde, so wandert KCN während der Elektrophorese aus dem Hb-Bereich heraus, und die nachher eluierten Hb-Fraktionen sind wieder KCN-frei. Wir verwenden jetzt zur Elution *Aqua dest.* mit Zusatz von $^1/_{50}$ Vol. 5% KCN. Dadurch wird das sich spontan bildende Hämiglobin laufend in Cyanhämiglobin übergeführt, dessen Soretbande derjenigen von Oxy-Hb sehr nahe liegt (420/415 mμ). Trotzdem sinkt aber die Extinktion des Eluates innerhalb von 4 h um 5,5% und innerhalb von $6^1/_2$ h um 6,7% ab. Es ist deshalb unerlässlich, alle Arbeitsgänge von der Elution bis zur Messung am Photometer in möglichst kurzer Zeit zu erledigen, jede

[7] W. KÜNZER und E. AMBS, Klin. Wschr. *37*, 249 (1959).

[8] J. H. P. JONXIS und T. H. J. HUISMAN, *Abnormal Haemoglobins* (Blackwell Scientif. Publ. Oxford 1959), p. 16.

stärkere Erwärmung der Hb-Lösungen zu vermeiden und wenn möglich zum Zentrifugieren eine Kühlzentrifuge zu verwenden.

Summary. A simple apparatus for starch block electrophoresis is described. The cooling element consists of a commercially available cold plate in metal.

If oxyhaemoglobin is used, an error in measurement by the instability of the haemoglobin solutions can be reduced by adding small amounts of KCN, not only to the initial haemolysate, but also to the haemoglobin fractions which were eluted.

H. R. Marti[9]

Medizinische Universitätspoliklinik Basel, 28. Februar 1961.

[9] Wir danken Frl. L. Bargetzi für ihre technische Hilfe bei allen Untersuchungen.

Durchlaufende Dünnschicht-Chromatographie

Bei kleinen Unterschieden von Rf-Werten muss zur vollständigen chromatographischen Trennung eines Substanzpaares die Laufstrecke vergrössert werden. Diese Forderung ist für langsam wandernde Substanzen leicht erfüllbar, indem man die mobile Phase über den Bereich der stationären Phase hinausströmen lässt. In der Papierchromatographie ist dieses als Durchlaufmethode bezeichnete Verfahren in besonders einfacher Weise realisierbar[1]. Wir beschreiben im folgenden eine Form, die sich bei Dünnschicht-Chromatogrammen bewährt hat.

Als erster hat unseres Wissens Mottier[2] die Dünnschicht-Chromatographie mit einem Durchlaufverfahren kombiniert. Seine Methode ist indessen auf die Verwendung von relativ schwerflüchtigen Lösungsmitteln wie Wasser und *n*-Butanol beschränkt. Unser Prinzip (Fig. 5) ist demgegenüber vielseitig anwendbar. Die mobile Phase wird dabei durch die Kapillarwirkung von Filterpapier auf die horizontal liegende Dünnschicht übertragen und kann nach Durchlaufen der Trennstrecke, die oben durch eine Deckplatte geschützt ist, verdampfen. Zwei längsseits zwischen Dünnschicht- und Deckplatte angebrachte Glas- oder Polyäthylenbänder dienen als Dichtung und gewährleisten genügend Abstand von Schicht zu Deckplatte, um das Eindringen von mobiler Phase in den Zwischenraum zu verhindern. Diese Anordnung lässt sich auch für «normale» Dünnschicht-Chromatogramme verwenden und erübrigt die sonst übliche Benützung von Trennkammern[3].

A) *Benötigte Einzelteile*

1. *Ein Behälter B aus rostfreiem Stahl* (Fig. 1). Er besitzt eine plangeschliffene Oberseite und dient als Gefäss für die mobile Phase. Durch die beiden Löcher L in der Seitenwand werden 2 etwa 7 cm lange Polyäthylenröhrchen R gesteckt und nach Figur 1 aufwärts gebogen. Durch eines wird später die mobile Phase eingefüllt, das andere ermöglicht den Druckausgleich (s. u.).

2. *Ein Filterpapier F* (Fig. 2). Es überträgt die mobile Phase auf die Schicht. Der Teil *efgh* ist dem Innenprofil des Behälters B anzupassen. Bei Verwendung einer leichtflüchtigen mobilen Phase kann dasselbe Filterpapier mehrmals benutzt werden.

3. *Eine Trägerplatte T, 200 × 200 mm* (Fig. 3). Sie trägt die Dünnschicht, zum Beispiel Kieselgel. An 2 gegenüberliegenden Rändern wird mit dem Finger soviel von der Schicht abgestreift, dass etwa 6 mm breite, völlig blanke Streifen entstehen. Auf der Vorderseite (Fig. 3) werden die Substanzen in gewohnter Weise 15 mm vom Plattenrand entfernt aufgetragen. Es ist empfehlenswert, im rechten Winkel zur Streichrichtung zu chromatographieren.

4. *Eine Deckplatte D, 200 × 200 mm, mit «Kufen»* (Fig. 4). Als Kufen werden auf 2 gegenüberliegenden Seiten einer planen Glasplatte (zum Beispiel blanke

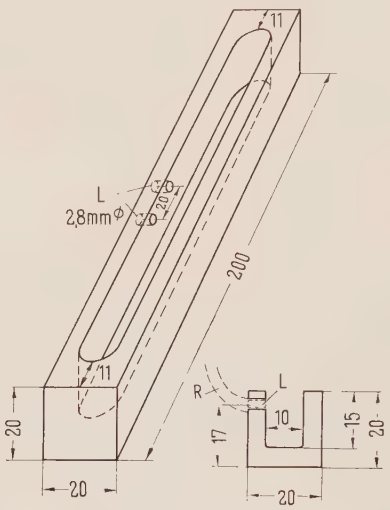


Fig. 1. Behälter aus V4A-Stahl für die mobile Phase. Längenmasse in mm.

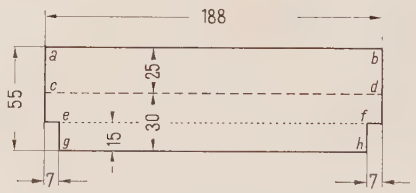


Fig. 2. Filterpapier Whatman No. 1 (Schnittbogen). Längenmasse in mm.

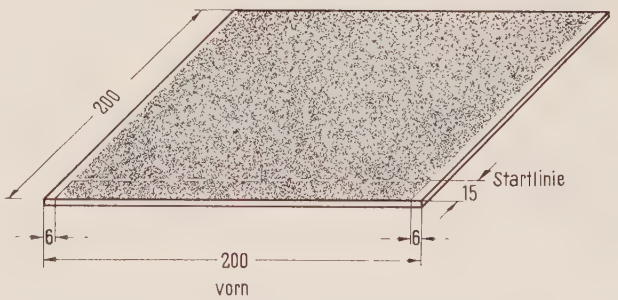


Fig. 3. Trägerplatte mit Dünnschicht und blanken Rändern. Längenmasse in mm.

[1] F. Cramer, *Papierchromatographie*, 4. Aufl. (Verlag Chemie GmbH, Weinheim an der Bergstrasse 1958), p. 49.

[2] M. Mottier, Mittlg. Lebensmittelunters. u. Hygiene (Bern) *49*, 454 (1958).

[3] Vgl. E. Stahl, Chemiker Ztg. *82*, 323 (1958).

Dünnschichtplatte) 2 Glasbänder G (180 × 4 × 1 mm) aufgeschweisst und plangeschliffen[4]. Die Kufen garantieren den notwendigen minimalen Abstand zwischen Schicht und Deckplatte (s.u.) und wirken zugleich als Dichtung. Die Glasbänder können behelfsmässig durch Polyäthylenstreifen ersetzt werden, die man sich selber aus 1 mm dicker Polyäthylenfolie schneidet. Polyäthylen verzieht sich aber je nach dem Charakter der mobilen Phase; solche Streifen können deshalb nicht gut auf die Deckplatte geklebt werden.

5. *Sechs kräftige Papierklammern.* 2 grosse Klammern GK (Öffnungsweite ca. 3 cm) und 4 mittlere Klammern MK (Öffnungsweite ca. 1,5 cm) dienen dazu, den Behälter B und die Trägerplatte T gegen die Deckplatte D zu pressen (Fig. 5).

6. *Eine Unterlage.* Am einfachsten verwendet man einen Korkring (Durchmesser ca. 12 cm).

B) *Montage und Betrieb*

Die Deckplatte liegt mit den Kufen nach oben auf dem Korkring K. Man faltet das Filterpapier längs der Linie *cd* (Fig. 2) und legt es mit dem Stück *abcd* nach unten auf die Vorderseite der Deckplatte (Fig. 4). Das Papier soll die Kufen nicht berühren und der Abstand der Kante *ab* vom Vorderrand der Deckplatte soll 1–3 mm betragen. Diese Lage wird provisorisch mit einer grossen Papierklammer fixiert. Man legt jetzt die Trägerplatte so auf die Deckplatte, dass ihre blanken Streifen auf die Kufen zu liegen kommen und ihr Vorderrand genau mit den vorderen Kufenkanten zusammenfällt. Träger- und Deckplatte werden nun durch die 4 mittleren Papierklammern zusammengepresst und die überflüssig gewordene grosse Klammer am Filterpapier wird wieder entfernt. Man biegt den oberen Teil des Filterpapiers längs der Linie *ef* (Fig. 2) in vertikale Lage und stülpt die zusammengeklemmten Platten um, so dass sich das Filterpapier nunmehr auf der Unterseite befindet. Nach Figur 5 wird der Behälter B mit den zwei grossen Klammern in solcher Weise unter die Deckplatte geklemmt, dass der vertikal stehende Teil des Filterpapiers auf den Grund von B reicht und der horizontal liegende Teil als Dichtung zwischen Deckplatte und Oberseite von B wirkt. Der Behälter soll dicht gegen die Trägerplatte stossen. Man füllt durch ein Polyäthylenröhrchen R 15 ± 5 ml mobile Phase ein, erreicht durch leichtes Schwenken eine momentan gleichmässige Benetzung des Filterpapiers und kann jetzt die Anordnung sich selbst überlassen. Die mobile Phase verdampft nach Durchlaufen der von der Deckplatte geschützten Schicht auf dem noch verbleibenden Streifen (Fig. 5) genügend rasch, um die Chromatographie stundenlang in Gang zu halten (vgl. [5]).

Störungen: Schwankungen der Raumtemperatur können gelegentlich (besonders bei starker Luftbewegung) dazu führen, dass mobile Phase an der Deckplatte kondensiert. In solchen Fällen genügt es aber, die Deckplatte durch kurzes Auflegen der Hand etwas zu erwärmen. – Randeffekte sind bei sorgfältiger Montage praktisch vermeidbar.

C) *Anwendung*

Wir haben die beschriebene Methode am Testgemisch von STAHL (Buttergelb, Sudanrot G und Indophenol) ausprobiert und mit Erfolg zur Trennung innerhalb nachstehender Gruppen angewendet[6]:

1. Leucin + Isoleucin. 2. N-(2,4-Dinitrophenyl)-leucin + N-(2,4-Dinitrophenyl)-isoleucin + N-(2,4-Dinitrophenyl)-norleucin. 3. N-(2,4-Dinitrophenyl)-valin + N-(2,4-Dinitrophenyl)-norvalin. 4. O,N-Di-(2,4-dinitrophenyl)-tyrosin + N,N′-Di-(2,4-dinitrophenyl)-lysin[6].

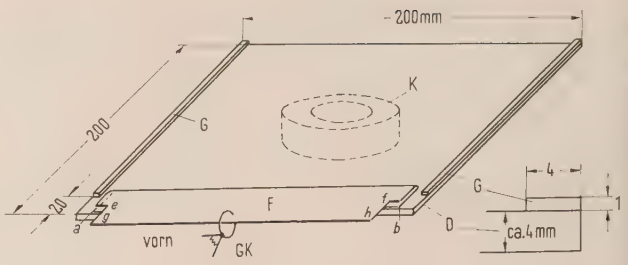


Fig. 4. Deckplatte mit montiertem Filterpapier. Längenmasse in mm.

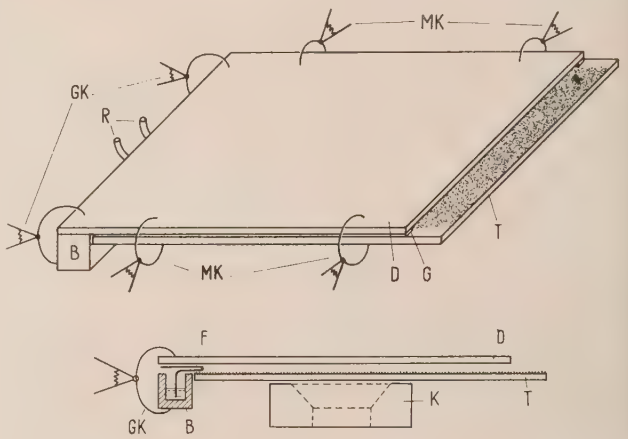


Fig. 5. Apparatur für durchlaufende Dünnschicht-Chromatographie: Querschnitt und Aufsicht. Klammern (GK und MK) schematisch.

Natürlich ist sie nicht auf diese Stoffklassen beschränkt, sondern ebenso universal anwendbar wie die durchlaufende Papierchromatographie.

Die bei der aufsteigenden Methode so überaus wichtige[7] Kammersättigung ist hier ohne Bedeutung. Man wird deshalb diese Apparatur unter Umständen auch dann benutzen, wenn man zur Trennung nicht auf den Durchlauf angewiesen ist.

Summary. The scope of thin layer chromatography has been extended by developing a simple arrangement which forces solvent fronts to run over. The method was successfully applied to the separation of closely interrelated and otherwise hardly separable materials[5].

M. BRENNER und A. NIEDERWIESER[8]

Institut für organische Chemie der Universität Basel, 1. März 1961.

[4] Ausführung durch die Küvettenfabrik Hellma GmbH & Co., Glastechnische-Optische Werkstätten, Müllheim (Baden).

[5] M. BRENNER, A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, Exper. *17*, 145 (1961).

[6] Di-DNP-Tyr und Di-DNP-Lys sind im verwendeten Lösungsmittelsystem durch normale Dünnschicht-Chromatographie nicht trennbar[5].

[7] E. STAHL, Arch. Pharm. *292/64*, 411 (1959).

[8] Wir danken den Herren E. LÜSCHER und A. MANZETTI für wertvolle Anregungen und ihr reges Interesse an dieser Arbeit. Im übrigen danken wir für eine Unterstützung durch Arbeitsbeschaffungskredite des Bundes und eine Studienbeihilfe vom Kultusministerium Baden-Württemberg.

PRO EXPERIMENTIS

A New Biopsy-Tube for the Small Intestine

The necessity of a direct control of the mucosa of the small intestine has suggested—in recent years—several attempts at deduction by means of proof-sticks for biopsy (SHINER[1]; CROSBY and KUGLER[2]).

CROSBY and KUGLER[2] have produced a particular proof-stick, based on the working of the knife by means of an abasing mechanism. The knife is contained in a capsule which is fixed by fitting it in where a rubber membrane is interposed: there is a lateral orifice. The cutting apparatus is contained in the internal part of the capsule. It is formed by a wheeling stick provided with a sharp-cutting edge and with a spiral-spring: this, by the rubber membrane displaced by the decompression, releases the stick, which is previously put into tension and fixed by a metallic anchorage.

Our experience, of more than two years, on the use of CROSBY's proof-sticks has revealed several inconveniences. Firstly, the cutting may occur precociously before the mucous membrane is sufficiently sucked in; this is generally due to the imperfect tension of the rubber diaphragm which cannot be exactly graduated. Secondly, the movement of the knife may fail to occur; this is due to the inadequate elasticity of the spring and of the rubber membrane. Finally, the impossibility of graduating the sucking in may cause an excessive amount of stuff in the capsule. To this may follow an excessive deduction or an imperfect section with the impossibility of removing the proof-stick. All these inconveniences have caused 30% of failures in our cases.

For this reason it was necessary to find a solution and to this end we have made a new type of proof-stick.

Description of the apparatus. Our proof-stick is formed by a two-way pipe of polyethylene radiopaque 250 cm long, with a diameter of 2.5 mm. The two ways end at the oral extremity with two metallic cones for the insertion of

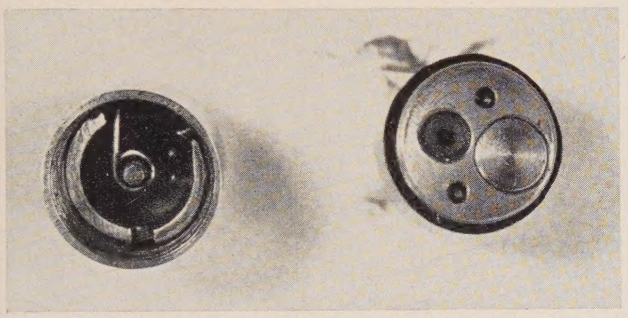


Fig. 1. Details of the capsule: left, distal extremity, right, proximal extremity.

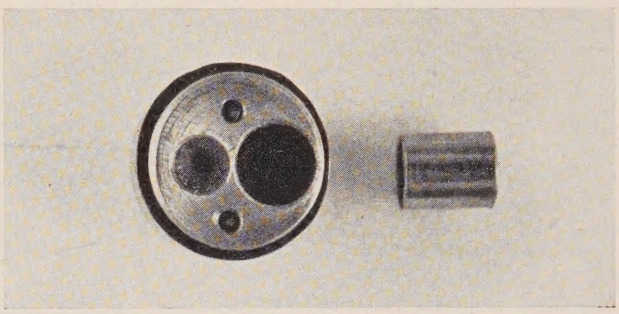


Fig. 2. Details of the proximal extremity; right, the piston.

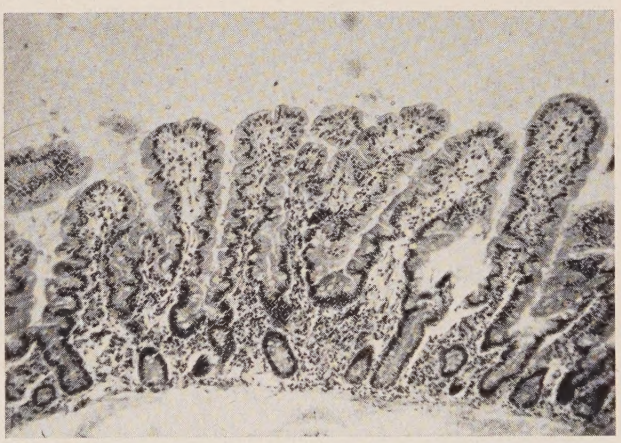


Fig. 3 and 4. Patterns of normal intestinal mucosa.

[1] M. SHINER, Lancet *1956 I*, 85.
[2] W. H. CROSBY and H. W. KUGLER, Amer. J. Dig. Dis. *2*, 236 (1567).

syringes. At the other end, a metallic capsule is fixed to the pipe, 20.5 mm long and with a diameter of 10 mm: it may be taken apart into two parts and screwed together in order to cause a perfect pneumatic closing and to avoid the decomposition of the capsule in the intestinal lumen. On the lateral area of the hemisphere, there is a hole of 4 mm for the working of the mucous membrane. The distal hemisphere of the capsule has a knife on a cylindrical block wheeling on a central axis by means of a spring wound on the same axis. The knife is put in charge-position by means of a key that is wheeled in the opposite direction to the spring and anchored to a metallic projection on the internal side of the hemisphere. The proximal hemisphere is formed by a metallic block in which two canals are contained. The smaller of these (diameter 2 mm) is joined to a piece of the polyethylene pipe to carry off the sucus. The second canal, diameter 4 mm, has a metallic piston joined with the second tube of the polyethylene pipe. The function of the piston is to move towards the distal hemisphere—under compression—and to press against the knife to cause the movement.

Execution of the biopsy. After fixing the knife in the position of charge, the proof-stick is swallowed and after 2–3 h we observe its position by means of the radioscopy. We suck up about 100 cm^3 until there is a feeling of stoppage; then, keeping the aspiration on, we put in, under pressure, 20 cm^3 of air in the pipe joined with the piston, by means of a second syringe: this causes the falling down and the following movement of the knife and the cutting of the hernial mucous membrane into the hole in the capsule.

The fragment of the mucous membrane is drawn out from the capsule and spread out on filter paper, to avoid its rolling up. Successively, the fragments are fixed with formaline and stained by the usual methods.

Casuistry. The biopsy has been made on 28 persons of both sexes: 14 were normal and 14 were patients with different digestive diseases such as chronic diarrhoea (4), chronic gastritis (7), chronic colecystitis (2) and malabsorptive syndrome (1).

In the choice of patients, we have taken note of some general opposite indications such as conditions of severe defaecation, hemorrhagic diathesis, cardiac vascular insufficiency, severe renal insufficiency.

Results. In the cases studied, the technique has always given positive results. In all patients we have got a fragment ranging from 2.5 mm to 3 mm in diameter. The histological study of the biopsy has shown an intestinal mucous membrane of a thickness ranging from the superficial epithelium to the muscular mucosa.

The biopsy has proved to be always without pain and it has never been followed by a syntomatology. In our cases, we have neither incidents nor later complications to complain of.

Conclusions. The results of our experience, though limited allow us to make some favourable observations on the methods employed.

The biopsic examination showed no unsuccessful results in all the cases we have studied. In fact, the independence of the fundamental manoeuvres for the deduction, aspiration-compression-section, removes the causes of error of the apparatus formerly used.

The quantity of material obtained in each case underlines the practical utility of the method for the object of diagnosis of affections of the small intestine.

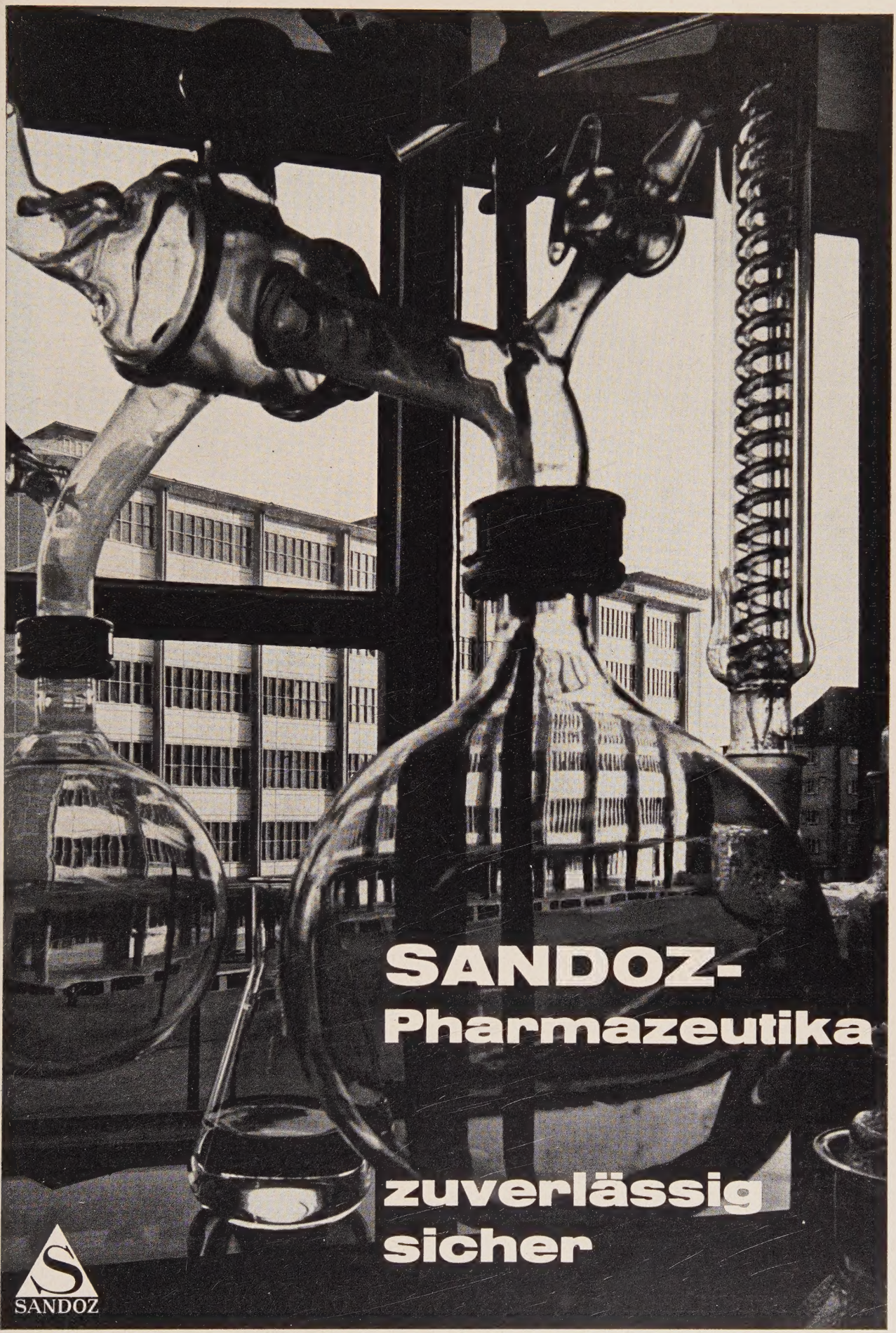
To all this, we must add the lack of unpleasant immediate or late consequences: this gives the technique a character of security and, consequently, shows its practical value for systematic investigations in many casuistries.

Zusammenfassung. Beschreibung einer neuen Sonde, die sich für Dünndarmbiopsie eignet und bei der die verschiedenen Vorgänge bei der Biopsie einzeln reguliert werden können. Es wird über Ergebnisse bei 28 Patienten berichtet, wobei keinerlei Komplikationen auftraten. In jedem dieser Fälle konnte eine histologische Wertung durchgeführt werden.

R. CHELI, M. DODERO[3], and G. CELLE

Istituto di Patologia medica, Università di Genova (Italy), July 29, 1960.

[3] Supported by the Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.


SANDOZ-
Pharmazeutika
zuverlässig
sicher
SANDOZ

Neuerscheinung

WERKSTOFFKUNDE DER KERNTECHNIK

Eine Einführung in die Eigenschaften und Probleme der Kernreaktorwerkstoffe

Band 19, Sammlung «Lehr- und Handbücher der Ingenieurwissenschaften»

von

DR. W. EPPRECHT

Titularprofessor an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich, Abteilung für industrielle Forschung des Instituts für Technische Physik

407 S. mit 141 Fig. (1961). Ganzleinen Fr./DM 57.50

Inhalt: I. Einführung in die Reaktortechnologie. II. Für den Reaktorbau wichtige Eigenschaften der Materialien III. Die Wirkung der Reaktorstrahlungen auf die Materialien. IV. Übersicht über die Reaktorwerkstoffe.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung · Obtainable from your bookseller · Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART

WE NEVER SAY "NO"

WE SHIP YOUR ORDER TODAY

(Air Mail or Parcel Post, as you wish)

18,000

CHEMICALS FOR IMMEDIATE DELIVERY FROM STOCK. LARGEST VARIETY ANYWHERE

Ask for our new catalogue

BIOS *Laboratories, Inc.*

17 West 60th St., New York City 23, U.S.A.

Kabeladresse: BIOSLAB

Neuerscheinung

Fortschritte der Arzneimittelforschung
Progress in Drug Research
Progrès des recherches pharmaceutiques

Herausgeber/Editor: DR. ERNST JUCKER, Basel
Vol. II (1960), 636 Seiten, sFr. 85.– (DM 85.–)

Die gute Aufnahme, die der *erste Band* in Fachkreisen gefunden hat, zeigt, dass die neue Reihe einem Bedürfnis entspricht. Der *zweite Band* wurde deshalb nach denselben Prinzipien aufgebaut; er enthält neun Beiträge.
The *first volume* was well received and this shows that the new series has satisfied an existing demand. The *second volume* was therefore put together on principles similar to these of the first one, but contains nine contributions.
L'accueil fait au *premier volume* par les milieux scientifiques montre que cette nouvelle série répond à un réel besoin. Aussi le *second volume* a-t-il été conçu selon les mêmes principes; il se compose toutefois de neuf articles.

INHALT / CONTENTS / SOMMAIRE

Newer Diuretics, by K. H. BEYER, jr., and J. E. BAER – Anabolic Steroids, by B. CAMERINO und G. SALA – Chemical Nature and Pharmacological Actions of Quaternary Ammonium Salts, by C. J. CAVALLITO and A. P. GRAY – Über Vorkommen und Bedeutung der Indolstruktur in der Medizin und Biologie, von A. CERLETTI - Über neue Arzneimittel, von W. KUNZ – Ganglienblocker, von K. NADOR – Monoaminoxydase-Hemmer, von A. PLETSCHER, K. F. GEY und P. ZELLER – The Structure and Biogenesis of Certain Antibiotica, by W. A. SEXTON – Antimetabolites and their Revolution in Pharmacology, by D. W. WOOLLEY.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung – Obtainable from your bookseller
Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART